

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET EN BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
MARTIN LAPIERRE**

**L'ENDOMÈTRE, UN MILIEU POTENTIELLEMENT FAVORABLE AU
DÉVELOPPEMENT TUMORAL : ACTION DES FACTEURS SOLUBLES DE
MACROPHAGES POLARISÉS SUR L'ACTIVATION DES CELLULES DU
CANCER ENDOMÉTRIAL**

Mars 2009

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier mon directeur de maîtrise M. Carlos Reyes-Moreno Ph.D pour avoir accepté de me prendre sous son aile durant ces années d'étude. L'idée d'arriver dans un nouveau laboratoire était stimulante et aura été très enrichissante. Si un jour je suis patron, j'essaierai d'être comme lui. Je tiens également à remercier Tony Maurais pour les années très amusantes où je l'ai côtoyé et pour avoir ri, ou enduré, mes blagues et mes commentaires. Il me faut également remercier le laboratoire du Dr. Éric Asselin pour nous avoir soutenu et aidé, particulièrement au tout début. J'aimerais aussi remercier Céline Van Themche pour ses conseils techniques et ses idées toujours à propos.

J'aimerais aussi remercier l'UQTR pour avoir fourni un environnement de travail où l'on favorise la proximité et l'interaction des professeurs chercheurs avec les étudiants.

Finalement, je dédie ce travail à ma mère qui est décédée durant la réalisation de mes travaux.

RÉSUMÉ

Depuis quelques années, des études montrent que les tumeurs solides sont infiltrées par de nombreux leucocytes qui normalement participent à l'élimination des cellules anormales. Les macrophages font partie de ces cellules infiltrant les tumeurs, on les appelle TAMs (*tumor-associated macrophages*). Il a été proposé que les TAMs soient d'un phénotype particulier, M2. Les macrophages M2 sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus après l'infection ou les blessures. Ils ne sont pas adaptés pour attaquer les cellules anormales comme les macrophages classiques M1. Peu d'études concernant les TAMs associés au cancer endométrial sont disponibles. L'hypothèse de ce travail propose que l'endomètre soit un milieu potentiellement propice au développement des tumeurs où les macrophages polarisés en M1 ou M2 participeraient à la progression tumorale via la sécrétion de facteurs solubles. Cette hypothèse a été évaluée par l'utilisation de biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux d'une part, et un modèle *in vitro* de macrophages polarisés et la lignée cancéreuse endométriale Hec-1A, d'autre part. Les résultats des biopsies indiquent que l'endomètre contient des cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- β ainsi que des marqueurs des macrophages. Les résultats suggèrent également la présence de cellules T régulatrices, via l'expression de FoxP3, dans les tissus analysés. Les résultats de stimulation de la lignée Hec-1A par les facteurs solubles révèlent que les macrophages de type M1 inhibent la prolifération cellulaire des Hec-1A alors que ceux de type M2 la stimule. L'analyse de l'expression des gènes révèle que les facteurs solubles de M1 induisent des gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-6, le TNF- α , le LIF, des chémokines comme MCP-1 et CCL22, ce qui n'est pas le cas des milieux M2. Les facteurs solubles de M1 modulent en outre l'activation des voies de signalisation STAT3 et p38 contrairement au milieu de type M2. Ces résultats suggèrent que *in vitro*, les macrophages polarisés peuvent sécréter une variété de facteurs solubles qui influencent directement l'activation des cellules cancéreuses Hec-1A.

Mots clés : cancer, endomètre, macrophage, polarisation, TAM, inflammation

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix

CHAPITRE 1

1	Système immunitaire et inflammation	1
1.1	Système immunitaire inné.....	1
1.2	Système immunitaire adapté	3
1.3	Réponse inflammatoire	8
1.3.1	Macrophages	10
1.3.2	Les polymorphonucléaires et inflammation.....	13
1.3.3	Les lymphocytes Th	14
2	Structure et fonction de l'endomètre	16
2.1	L'Endomètre	16
2.2	Population leucocytaire de l'endomètre.....	20
2.3	Cytokines et chémokines dans l'environnement endométrial.....	23
2.4	M-CSF et GM-CSF	23
2.5	Leukemia inhibitory factor (LIF).....	24
2.6	Cytokines pro-inflammatoires.....	25
3	Inflammation et cancer.....	26
3.1	Inflammation et pathologies humaines	26
3.2	Inflammation et cancer endométrial.....	27
3.3	Facteurs de transcription et voies de signalisation dans les cancers	30
3.3.1	Facteurs de transcription NF-kB	30
3.3.2	Voie des JAK/STAT	31
3.3.3	Voie p38/MAPK	35
3.4	Les macrophages associés aux tumeurs	38
3.5	Les cellules T régulatrices et les cancers	38

4	Projet de recherche	40
4.1	Problématique et hypothèse	40
4.2	Méthodologie	44
4.2.1	Biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux	44
4.2.2	Monocytes du sang périphérique	44
4.2.3	Lignées cellulaires utilisées.....	46
4.2.4	Essai de prolifération.....	46
4.2.5	Isolation d'ARNm et RT-PCR	47
4.2.6	Analyse par Western Blot	48
4.2.7	Analyses informatiques	50
4.3	Résultats	51
4.3.1	Les biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux contiennent des marqueurs cellulaires des macrophages mais aussi des cytokines immunosuppressives telles que TGF- β et IL-10.	51
4.3.2	La prolifération des cellules cancéreuses est diminuée par les milieux conditionnés GM1, GM2, MM1 mais augmentée par celui de MM2.....	53
4.3.3	Les milieux conditionnés de macrophages modulent l'expression d'une variété de cytokines pro-inflammatoires, des chémokines et des protéines régulatrices de la voie STAT3.....	54
4.3.4	Les milieux conditionnés de macrophages activent différemment les voies JAK/STAT/SOCS et p38 dans la lignée Hec-1A.....	60
4.4	Discussion	63
4.5	Conclusions et perspectives	71
	RÉFÉRENCES.....	75

LISTE DES TABLEAUX

1.1 Cytokines et chémokines pro-inflammatoires.....	4
2.1 Distribution des leucocytes endométriaux selon les phases du cycle menstruel.....	21
3.1 Maladie inflammatoires ou infectieuses associées à un risque accru de développer un cancer.....	26
3.2 Facteurs de risques associés au cancer endométrial et leur correspondance inflammatoire.....	28
4.1 Amorces utilisées pour les analyses RT-PCR.....	49

LISTE DES FIGURES

1.1 Résumé de l'immunité innée.....	2
1.2 Système immunitaire adapté.....	5
1.3 Réaction inflammatoire.....	9
1.4 Propriétés des macrophages polarisés en M1 ou M2.....	12
1.5 Différenciation des cellules Th lors de la rencontre avec une APC.....	14
2.1 Structure de l'utérus.....	17
2.2 Blastocyste humain.....	18
3.1 Relation entre le déséquilibre hormonal, les facteurs de risque et de protection dans l'inflammation associée au cancer endométrial... ..	29
3.2 Exemple de signalisation par la voie JAK/STAT.....	32
3.3 Régulation des STATs par les protéines SOCS.....	34
3.4 Conséquences de l'activation de la MAP kinase p38.....	37
4.1 Différenciation et polarisation des macrophages.....	45
4.2 Expression des marqueurs des macrophages dans les biopsies de tissus endométriaux.....	51
4.3 Expression des cytokines immunosuppressives et marqueurs des cellules Treg dans les biopsies de tissus endométriaux.....	52
4.4 Les milieux conditionnés de macrophages GM1, GM2 et MM1 diminuent de façon notable la prolifération des cellules Hec-1A	54
4.5 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent l'expression de MCP-1 après 6h de stimulation	55
4.6 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent CCL22 après 6h de stimulation	56
4.7 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent TNF- α après 6h de stimulation.....	57
4.8 Les milieux conditionnés de GM1 et MM1 induisent le LIF après 6h de stimulation.....	58
4.9 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent CCL22 après 6h de stimulation.....	59

4.10 Les facteurs solubles provenant de GM1 et MM1 activent STAT3 à 5 et 15 minutes de stimulation dans les Hec-1A.....	60
4.11 Induction de SOCS-1 et SOCS-3 par les milieux conditionnés de macrophages.....	62
4.12 Les facteurs solubles de GM1 et MM1 activent p38 après 15 minutes.....	63
4.13 Modèle d'action des TAMs.....	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AKT	Protéine kinase B
APC	Cellule présentatrice de l'antigène
DC	Cellule dendritique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Tc	Lymphocyte T cytotoxique
Th	Lymphocyte T auxiliaire
Treg	Lymphocyte T régulateur
PMN	Polymorphonucléaire (neutrophile, basophile, éosinophile)
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
FoxP3	<i>Forkhead/winged-helix protein 3</i>
ICAM	Molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines
IFN	Interféron
IκB	Inhibiteur de kappa B
IL	Interleukine
JAK	Kinase Janus
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MCP-1	<i>Monocyte/macrophage chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
MC	Milieu conditionné
MMP	Métalloprotéase matricielle
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
KO	Knock-out
NK	Cellules tueuses naturelles
NO	Oxyde nitrique
iNOS	Oxyde nitrique synthétase inductible
PGE	Prostaglandine

ROI	Intermédiaires réactifs de l'oxygène
RT-PCR	Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérase
STAT	Transducteurs du signal et activateurs de la transcription
SOCS	Suppresseur de la signalisation par les cytokines
TAM	Macrophages associés à la tumeur
TGF	Facteur de croissance tumorale
TLR	Récepteur Toll-like
TNF	Facteur de nécrose tumorale
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
FGF	Facteur croissance des fibroblastes

CHAPITRE 1

1 Système immunitaire et inflammation

1.1 Système immunitaire inné

Les organismes vivants multicellulaires ont développé des mécanismes de défense contre les agressions. Parmi ces mécanismes, l'immunité innée ou naturelle constitue la première et la plus importante ligne de défense de l'organisme. En effet, chez les organismes métazoaires, à l'exception des vertébrés, elle représente l'unique moyen de défense. Seuls les organismes plus évolués ont développé une immunité adaptée. L'immunité innée est donc le point de départ de la réaction immunitaire globale qui mènera ultimement à l'élimination du pathogène (1).

La réponse immunitaire innée est la plus souvent déclenchée lors d'une infection ou au cours d'une blessure par exemple. Parmi nos mécanismes de défense naturels pour faire face à ce type d'agression, on compte : 1) une barrière anatomique intacte comme les muqueuses et la peau; 2) une augmentation de la température du corps; 3) le pH acide sur la peau et dans notre estomac qui est défavorable à la croissance d'une majorité de microorganismes. Ces mécanismes sont très efficaces mais peuvent s'avérer insuffisants lorsque le tissu est infecté suite à une lésion. D'autres causes, comme des traumatismes internes ou les allergies peuvent induire des réactions inflammatoires sans présence d'infection. La figure 1.1 de la page suivante résume l'immunité innée et ses principales composantes.

Lorsque les barrières physiques sont franchies par un pathogène, il rencontrera nécessairement des cellules spécialisées qui assurent la protection des tissus : les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques (DC) et les mastocytes. Ces cellules font partie de l'immunité innée car la réponse qu'elles engendrent n'est pas spécifique d'un pathogène particulier. Elles peuvent s'activer rapidement via leurs récepteurs de surface spécialisés les *Toll-like receptors* (TLR) (3). Ces récepteurs reconnaissent les mosaïques de protéines et de glycolipides présents sur les surfaces bactériennes ou sur les virus mais qui ne se retrouvent pas sur les cellules de l'hôte (4). D'autres cellules, les NK sont spécialisées dans la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées par des pathogènes. Elles reconnaissent certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) spécifiques à l'hôte. Une expression anormale du CMH est souvent signe d'une infection ou d'une anomalie à l'intérieur de la cellule. Ceci déclenche l'activation des récepteurs sur les cellules NK. Ces cellules pourront alors induire une réaction inflammatoire qui favorisera l'élimination du pathogène et la réparation tissulaire. Les molécules fréquemment citées comme inducteurs de la réaction inflammatoire d'origine infectieuse sont les endotoxines bactériennes, le lipopolysaccharide (LPS) étant le représentant par excellence. Ce glycolipide est très bien conservé à travers les souches Gram négatives. Récemment, on a découvert d'autres mécanismes utilisés par les macrophages pour détecter la présence des pathogènes qui impliquent les *Nod-like receptors* par opposition à *Toll-like receptor* (5). Ces récepteurs peuvent agir en reconnaissant un changement de concentration d'ion intracellulaire, de l'ADN bactérien ou l'ARN double brin de virus (6).

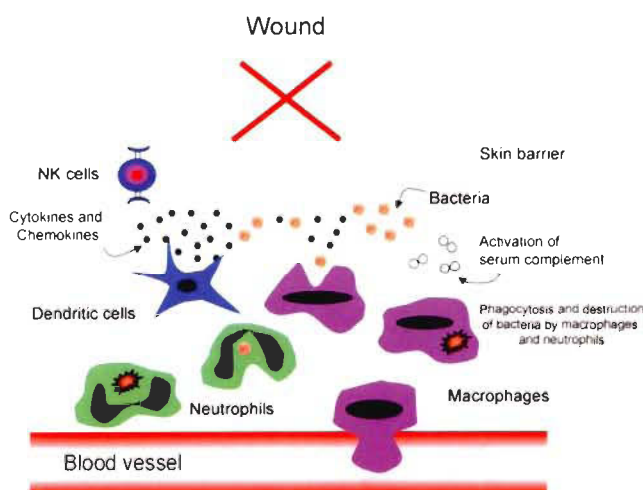


FIGURE 1.1 Résumé de l'immunité innée. Elle constitue la première ligne de défense de l'organisme. On distingue les composants suivants : 1) barrière physique via les épithéliums; 2) barrière phagocytaire; 3) protéines plasmatiques du complément. Tiré de (2)

Lorsque les macrophages et les neutrophiles s'activent, ils libèrent des cytokines inflammatoires qui démarreront et soutiendront la réaction inflammatoire (3). Le tableau 1.1, bien que non exhaustif, en donne quelques exemples. Les macrophages et neutrophiles sécrètent des enzymes lytiques et des dérivés oxygénés, comme le peroxyde, qui réussissent, la plupart du temps, à éliminer les microorganismes envahissants de façon efficace.

1.2 Système immunitaire adapté

Lorsque les mécanismes de défense non spécifiques ne sont pas suffisants, un autre volet de l'immunité entre en interaction très étroite avec l'immunité innée. (voir figure 1.2, page 5). Les macrophages et les cellules dendritiques, particulièrement, sont essentiels pour activer l'immunité adaptée. Cette dernière agit par l'intermédiaire de cellules spécialisées, les lymphocytes B et T. Les lymphocytes eux-mêmes se sous divisent en T auxiliaires CD4+ (Th) et T cytotoxiques CD8+ (Tc) et T régulateurs (Treg). La réponse adaptée se distingue de la réponse innée par une haute spécificité de reconnaissance ainsi qu'une capacité de mémoire lors d'infections subséquentes. En effet, les lymphocytes T qui ont déjà été activés lors d'une infection précédente resteront dans la circulation plusieurs années. Lors d'infections subséquentes par les mêmes antigènes, ces lymphocytes pourront s'activer de façon plus rapide que leur contrepartie naïve. On croit qu'elles n'ont pas besoin d'autant de signaux de costimulation que les cellules naïves, accélérant d'autant leur réactivation lors d'infections subséquentes (7).

Les cellules B peuvent reconnaître directement un antigène via leur anticorps membranaire. Lorsqu'elles rencontrent leur cible, elles s'activent et se divisent en deux populations qui donneront les cellules sécrétrices d'anticorps, les plasmocytes, et des cellules B à mémoire qui se réactiveront plus rapidement dans l'éventualité d'une seconde rencontre avec le même antigène. Les plasmocytes élaborent et sécrètent les anticorps. Ces derniers sont des protéines de haut poids moléculaire capables de reconnaître une cible (antigène) spécifique et ce, à travers les milliers présents sur une seule cellule étrangère. Ces anticorps seront libérés dans la circulation et pourront favoriser l'élimination des pathogènes de plusieurs façons : 1) Neutralisation : en se liant

au pathogène, ils peuvent empêcher son entrée dans les cellules; 2) Opsonisation : ils favorisent la phagocytose en agissant comme des récepteurs pour les macrophages; 3) Activation du complément : les anticorps sont capables d'activer des enzymes lytiques circulant normalement sous forme inactive dans le sang et les tissus. (8)

La biologie des cellules T est différente par rapport à celle des cellules B dans la mesure où ces cellules ne peuvent pas s'activer directement en rencontrant un pathogène. En effet, leurs récepteurs membranaires ne sont pas des anticorps à proprement parler comme les cellules B. Leur activation requière l'action de cellules présentatrices d'antigènes (APC) (14). Les macrophages, les lymphocytes B et les DC

TABLEAU 1.1
Cytokines et chémokines pro-inflammatoires

Cytokine / chémokine	Action	Réf.
TNF- α	Favorise la phagocytose, la cytotoxicité des neutrophiles, l'angiogénèse	(3)
	Induction de gènes (IL-6, Fos, myc)	
	Inflammation locale	
	Activation des cellules endothéliales et stromales	
IL-6	Protéine de la phase aiguë	(3)
	Augmente la perméabilité vasculaire	
	Fièvre	
IL-1	Croissance des cellules B et T	(9, 10)
	Synthèse de PGE ₂ , IL-8, IL-6	
	Stimulation des cellules T auxiliaires	
MCP-1	Attraction des monocytes vers les tissus	(11- 13)
	Dégranulation des basophiles	
	Angiogénèse	
IL-8	Attraction des neutrophiles	(13)

sont considérés comme des APC, les DC étant reconnues comme professionnelles. Ces cellules vont présenter les antigènes à leur surface pour les lymphocytes Th qui pourront alors le reconnaître. La présentation de l'antigène se fait en combinaison avec les protéines de CMH. Le CMH se divise en deux classes : I et II. La classe I est présente sur toutes les cellules de l'organisme, incluant les cellules immunitaires à l'exception des érythrocytes et des plaquettes. Les molécules de classe II sont présentes uniquement sur les cellules immunocompétentes comme les APC. Lorsqu'une APC rencontre un agent infectieux ou pathogène présent au site d'inflammation, elle le phagocyte. Par la suite, la cellule va utiliser les fragments de protéines digérées qu'elle associera avec des

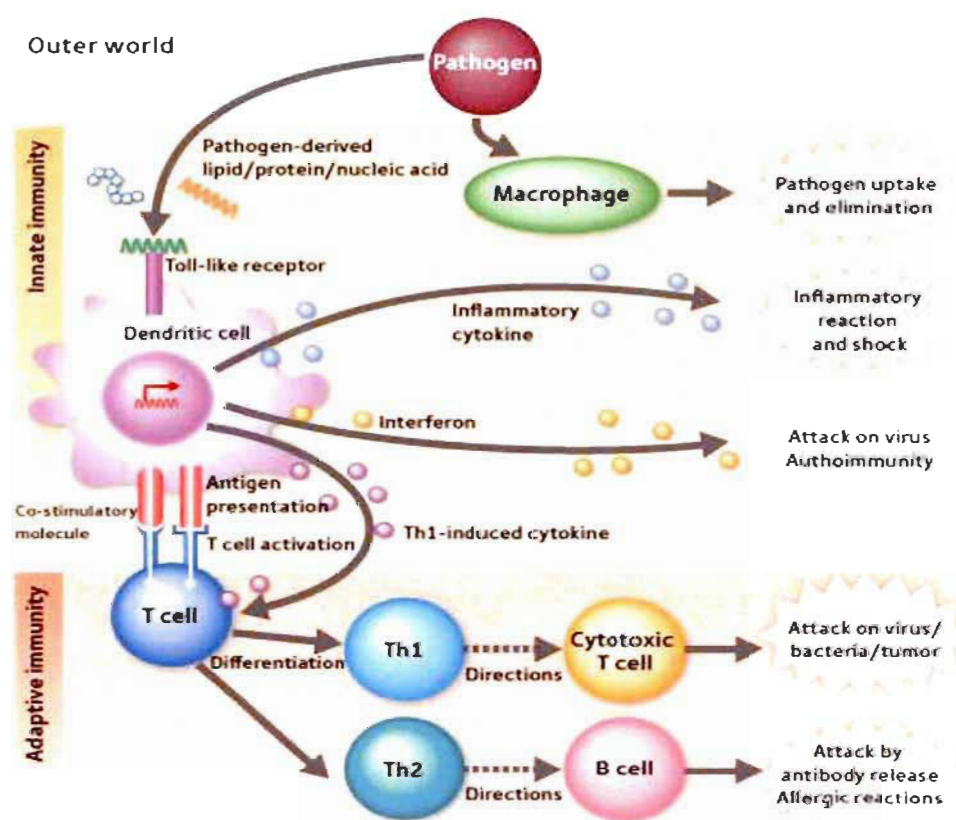


FIGURE 1.2 Système immunitaire adapté. Cette branche du système immunitaire se distingue du système immunitaire inné par la présence de cellules qui peuvent réagir spécifiquement à un pathogène particulier. Les lymphocytes Th sont activés par des APC et vont ensuite potentialiser l'action des lymphocytes B et T cytotoxiques. Les lymphocyte B vont ensuite produire des anticorps solubles largués dans la circulation qui protégeront lors d'infection subséquentes et pourront activer plus rapidement l'immunité adaptée. Image tirée de (12)

protéines du CMH de type II (15). Ce complexe sera dirigé en surface pour y être présenté aux cellules Th et agira comme signal d'activation si le lymphocyte Th rencontre sa cible. Une fois activé, le lymphocyte Th peut en retour stimuler les cellules B naïves pour favoriser leur activation car les cellules naïves (qui n'ont jamais rencontré leur antigène) sont plus difficiles à activer que des cellules mémoires par exemple.

Lors d'une infection par un pathogène intracellulaire ou un virus, les APC n'ont pas accès au pathogène, ainsi, la cellule infectée doit elle-même assumer la présentation des complexes antigène-CMH I à sa surface pour activer une cellule Tc. Une fois activée, un programme de destruction cellulaire permettra d'éliminer les cellules de l'hôte infectées. Les cellules Tc sécrètent des enzymes lytiques appelées perforines qui percent la membrane plasmique permettant aux granzymes de pénétrer. Les granzymes sont capables d'induire l'apoptose via les caspases (11). De plus, les cellules Tc expriment le FasL à leur surface qui peut donc activer la voie du Fas dans la cellule cible et ainsi induire la mort cellulaire. En effet, la voie du Fas, lorsque activée, induit l'activation de des caspases menant à l'apoptose cellulaire (16). Cela permet donc d'éliminer les cellules de l'hôte infectées.

La réponse immunitaire ne doit jamais devenir hors contrôle, au risque de s'attaquer à l'hôte. Certains lymphocytes particuliers, les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont capables de contrôler l'activation du système immunitaire adapté. Ils possèdent des fonctions et un phénotype distinct des lymphocytes Th et T cytotoxique (17). De façon générale, on classe les cellules Treg comme CD4+CD25+ (*cluster of differentiation* CD25, sous-unité α du récepteur de l'*interleukine-2* (IL-2)). Elles sécrètent principalement du *tumor growth factor-beta* TGF- β et de l'*interleukine-10* (IL-10) (18). Les cellules Treg CD4+CD25+ représentent environ 5-10% des lymphocytes T périphériques CD4+. Les premières publications à faire état de l'existence de cellules T régulatrices datent des années 1970. En 1974, Umiel et Trainin ont publié des données démontrant que des lymphocytes T isolés de souris, dont on avait injecté des cellules tumorales pulmonaires de Lewis, accélèrent la croissance de ces mêmes cellules tumorales lorsque qu'elles étaient injectées dans d'autres souris syngéniques (19).

Cependant, il faudra attendre les années 80 pour voir apparaître des publications démontrant directement l'existence des cellules Treg avec les travaux de Dye et North (20). Après inoculation de cellules de mastocytome P815, il avait remarqué que l'injection des cellules T sensibilisés de cette souris syngénique à une autre souris syngénique diminuait la réponse anti-cancéreuse médiée par les lymphocytes T. Après analyse, ils conclurent que des cellules immunosuppressives étaient responsables de cette diminution de réponse.

Les cellules Treg ne possèdent pas de récepteur ou de marqueur cellulaire unique. C'est pour cela que leur existence est restée longtemps inconnue. Cependant, un marqueur particulier, la sous-unité α du récepteur de l'interleukine 2, est particulièrement augmenté chez les Treg, ce qui permet de les isoler et les identifier par cytométrie en flux (21). Il existe une autre caractéristique qui permet de les détecter *in situ*. En effet, les cellules Treg expriment un facteur de transcription particulier, qui serait responsable de leur différenciation, le *forkhead/winged-helix protein-3* (FoxP3). Les protéines FOX font partie d'une famille de facteurs de transcriptions jouant un rôle important dans l'immunité, le développement embryonnaire et le métabolisme (22). Ces facteurs possèdent un seul site de liaison à l'ADN. Il prennent une forme d'hélice lors de la liaison à l'ADN d'où leur nom (23).

Les lymphocytes Treg, comme toutes cellules T, proviennent du thymus où ils subissent leur maturation. Des études chez des souris knock-out ont démontré que le CD28, CD40 et l'IL-2 sont nécessaires au développement et à la survie des lymphocytes Treg (24). Cependant, l'expression de FoxP3 semble être critique dès leur maturation pour leur permettre d'acquérir un phénotype immunosuppresseur. D'ailleurs, une délétion du gène FoxP3 chez la souris résulte en une disparition des cellules CD4+CD25+ et l'apparition de maladies auto-immunes dans plusieurs organes (25). Des études ont démontré que les cytokines comme le TGF- β et l'IL-10 jouent un rôle crucial dans l'induction de Foxp3, nécessaire pour induire la différenciation des lymphocytes CD4+CD25- en cellule CD4+CD25+ (26-28). Le TGF-bêta fait partie de la grande familles des *transforming growth factor* qui sont impliqués dans le contrôle de la

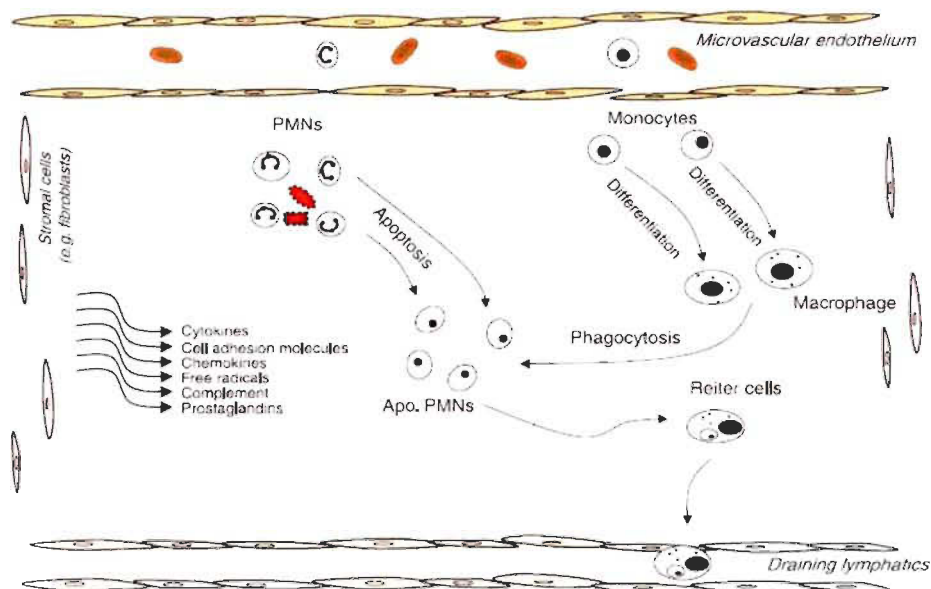
prolifération et de la différenciation cellulaire et l'expression de gènes (29). Les cellules Treg sont sensibles à certaines chémokines dont CCL22 et CCL17 qui régulent leur mouvement dans les tissus via leur récepteur CCR4 et CCR8 (30).

Les mécanismes par lesquels les Treg induisent la suppression de l'immunité ne sont pas encore clairs. Des chercheurs suggèrent que des cytokines comme l'IL-10 et le TGF- β sont indispensables pour observer une suppression (31) d'autres chercheurs proposent que les Treg nécessitent un contact cellule-cellule avec les cellules Th et Tc qui supprimerait leur prolifération et leur sécrétion d'IL-2, nécessaire à leur prolifération (32). D'autres auteurs rapportent que les Treg ont la capacité de diminuer l'expression des molécules du CMH II sur les cellules présentatrices d'antigènes, diminuant ainsi leur capacité à activer les cellules T effectrices (33).

1.3 Réponse inflammatoire

L'inflammation est l'un des mécanismes mis en jeu pour favoriser l'élimination de l'infection et/ou la réparation des tissus lésés. C'est un processus normalement véhiculé par des cellules dites inflammatoires telles que les macrophages et les neutrophiles mais aussi par les cellules stromales et endothéliales (34). C'est une réaction coordonnée par tout un réseau complexe de cytokines/chémokines possédant parfois des actions redondantes ou opposées (35). On distingue deux états d'inflammation: l'inflammation aiguë et chronique (figure 1.3). Le premier cas est un phénomène normal qui se déroule sur une courte période de temps, quelques heures voir quelques jours. Elle est très intense et a pour but de favoriser l'élimination des micro-organismes et la réparation des tissus. Elle repose sur un équilibre entre les facteurs pro- et anti-inflammatoires. La résolution de l'inflammation est un phénomène encore mal connu. On considère que l'événement le plus important dans la résolution de l'inflammation est l'élimination des neutrophiles dans les tissus (36). Des publications récentes remettent en question l'idée que l'arrêt de synthèse des médiateurs chimiques ou protéiques pro-inflammatoires puisse expliquer à lui seul la résolution de l'inflammation aiguë (37). On a mis en évidence depuis quelques années l'existence d'un véritable processus anti-inflammatoire actif. Une nouvelle classe de médiateurs dérivés des acides gras polyinsaturés oméga-3,

A) Début de l'inflammation



B) Perte de régulation

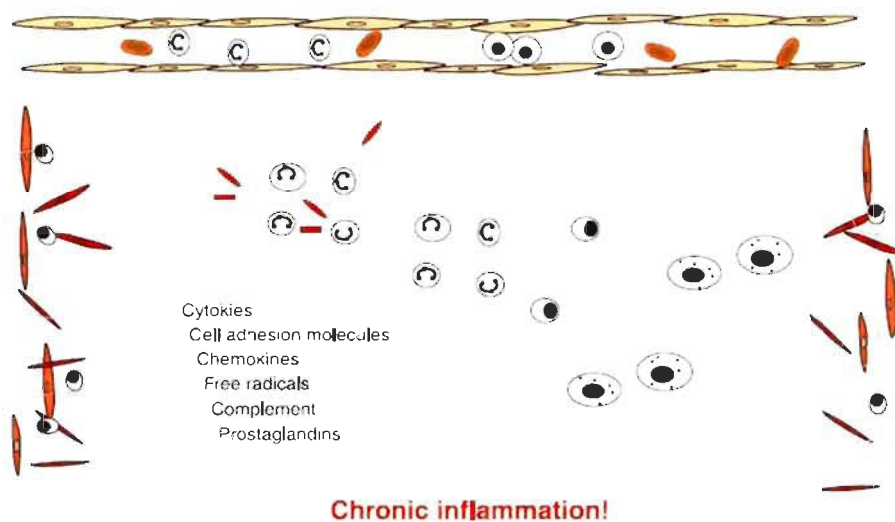


FIGURE 1.3 Réaction inflammatoire **A)** Schéma de la réaction inflammatoire normale. Suite à la lésion ou l'infection, les cellules stromales et les leucocytes résidents réagissent en sécrétant des cytokines, des prostaglandines et des chémokines qui perméabilisent le tissu et attire d'avantage de leucocytes. L'arrivée de nouveaux leucocytes viendra appuyer la réponse. Les macrophages peuvent phagocyter directement les pathogènes. Les macrophages seront ensuite drainés par les canaux lymphatiques. Quand le déficit antigénique est éliminé ou la lésion réparée, les cellules stromales reprennent leurs fonctions normales, les cytokines et médiateur anti-inflammatoires comme la resolvine E1 diminuent la perméabilité des tissus aux neutrophiles et favorise la phagocytose des ces derniers par les macrophages. **B)** Lorsque les conditions sont défavorables et que l'inflammation n'est pas contrôlée après un certain temps, bien qu'on ne comprenne pas encore complètement toutes les raisons complexes qui engendrent cette perte de régulation, on observe une destruction tissulaire qui elle-même peut engendrer une inflammation et perpétuer le cycle, détruisant d'avantage les tissus environnants. Ultimement, cela peut induire des mutations et d'autres dommages cellulaires. Tiré de (38)

et oméga-6 a été découverte. Ces médiateurs, la resolvine E1 et protectine D1, ressemblent aux prostaglandines déjà connues. Leur synthèse surviendrait dès le début de la réaction inflammatoire, par les cellules stromales et épithéliales. Ils agiraient en inhibant le recrutement des neutrophiles et en favorisant la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (36, 37).

Lorsque l'équilibre entre facteurs pro- et anti-inflammatoire est rompu, on peut observer soit une résolution de l'inflammation, soit le développement d'une inflammation chronique le cas échéant. Cette dernière est caractérisée par une perméabilité vasculaire accrue et persistante, une sécrétion inappropriée de cytokines inflammatoires par les cellules stromales et les leucocytes résidents, une activation persistante des leucocytes avec une sécrétion de protéines lytiques tel la perforine et les granzymes, qui déstabilise la membrane cellulaire, (39) et de dérivés oxygénés comme le superoxyde, entre autres (40).

1.3.1 Macrophages

Le macrophage est une des principales cellules inflammatoires localisées de façon permanente dans les tissus. On reconnaît depuis longtemps que les macrophages tissulaires sont des cellules très diversifiées. On en retrouve dans différents organes, comme les cellules microgliales dans le système nerveux (41), les cellules de Langerhans dans la peau (42), les cellules de Kupffer dans le foie (43). Il est à noter que la proportion de macrophages peut augmenter rapidement lors d'une infection sous l'effet des chémokines. En effet, les monocytes, précurseurs des macrophages, sont attirés de la circulation vers le tissu où ils se différencieront en macrophages matures en traversant la barrière endothéliale.

Les macrophages remplissent plusieurs fonctions physiologiques importantes au-delà de leurs fonctions immunes. Ils sont les spécialistes dans l'élimination des déchets cellulaires et des débris résultant de la mort par apoptose ou la réparation des tissus lors de lésions internes (44). Ils sont également responsables de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques lors de la résolution de l'inflammation. Ils participent donc à

l'homéostasie des tissus. Les macrophages ont développé toute une panoplie d'outils pour accomplir leurs tâches, par exemple, la dégradation de la matrice extracellulaire via les *métalloprotéinases matricielles* (MMP) (45). Ces protéines font partie de la famille des protéases qui sont utilisées par les cellules pour dégrader les protéines défectueuses ou trop vieilles. En outre, les macrophages produisent des facteurs angiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le *fibroblast growth factor* (FGF) (46). Ces protéines font parties des facteurs de croissance et stimulent la prolifération des cellules. On a montré que les macrophages sont également capables de dégrader le sulfate d'héparane (47), un constituant des matrices extracellulaires, et de synthétiser du TGF- β qui est capable d'activer la prolifération des cellules endothéliales (48). Ces fonctions réparatrices du macrophage sont nécessaires pour résorber la réaction inflammatoire qui inflige nécessairement des dommages importants aux tissus sains.

Depuis quelques années, il s'est développé une nouvelle vision du concept de macrophages activés (49-52). En effet, il était considéré depuis leur découverte que les macrophages formaient une population de cellules uniforme qui répondaient fortement à une présence d'INF- γ ou encore à la présence de pathogènes qui les activent. Le concept était que les macrophages étaient simplement inactivés par l'action de cytokines comme l'IL-4, l'IL-10 ou le TGF- β , qui peuvent provenir des lymphocytes Th2, ou encore par des hormones anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes (53). Les macrophages possèdent en effet des récepteurs sensibles au cortisol. Il est devenu clair depuis quelques années que ces macrophages que l'on considérait inactivés se révèlent, au contraire, actifs et fonctionnels (54). Les cytokines anti-inflammatoires induisent une réponse de type 2, en référence aux cytokines produites par les cellules Th2, et activent une série de gènes très différents comparés aux macrophages classiques. Ceci a mené à l'élaboration d'une nomenclature permettant de rendre compte de ces états d'activation ou de polarisation différents. On parle alors de macrophages M1 pour les classiques et de M2 pour ceux activés par les cytokines anti-inflammatoires. La figure 1.4 résume la polarisation des macrophages.

Les macrophages M1 sont les mieux connus et les mieux caractérisés puisqu'ils furent les premiers à être étudiés. On observe ce phénotype lorsque l'environnement est dominé par des cytokines de type 1, par exemple l'INF- γ ou le TNF ou encore lors de la présence de résidus bactériens ou viraux (55, 56). Ils sont nécessaires pour reconnaître et éliminer les pathogènes et micro-organismes et pour détruire les cellules cancéreuses, les cellules apoptotiques ou les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires. Ils sont capables d'inhiber la prolifération des cellules via la production de dérivés oxygénés ou azotés (NO, H₂O₂) et via toute une gamme de cytokines pro-inflammatoires (49). Ils sont également impliqués dans la présentation d'antigènes et ils expriment les récepteurs aux immunoglobulines FcR (*fragment crystallizable*) et favorisent ainsi la réponse adaptée par les lymphocytes Th et Tc et la réponse humorale par les lymphocytes B.

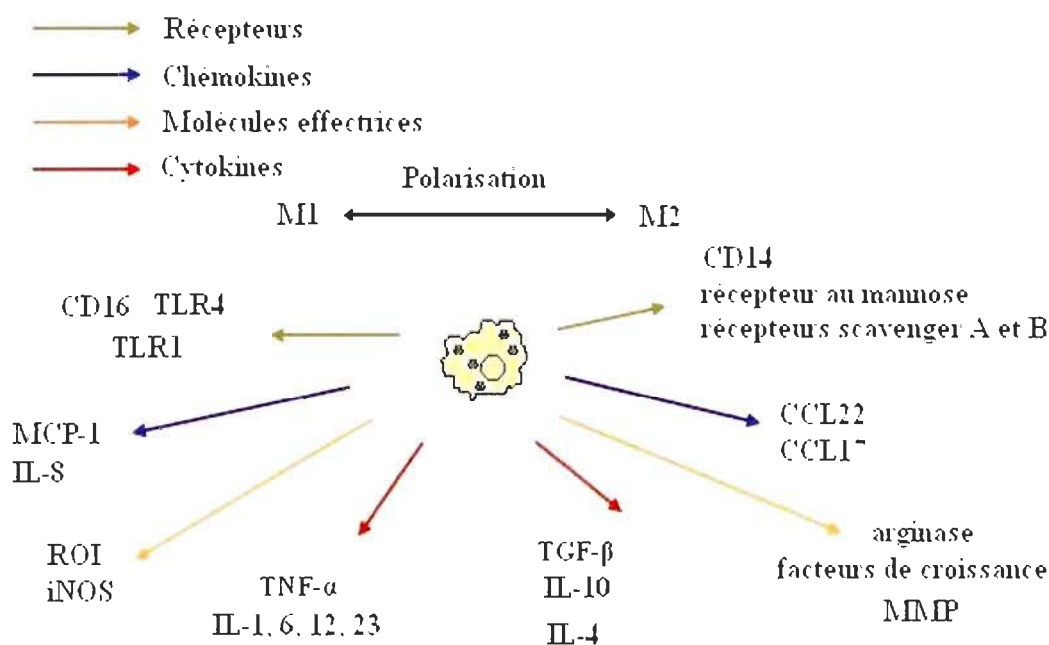


FIGURE 1.4 Propriétés des macrophages polarisés en M1 ou M2. Les macrophages M1 sont une source de dérivés oxygénés via les réactifs intermédiaires de l'oxygène (ROI) et l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS); ils possèdent des récepteurs Toll-like en plus grande proportion et sécrètent des chimokines et des cytokines inflammatoires. Les M2 sont mieux adaptés pour moduler l'inflammation par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10); des facteurs de croissance pour réparer les vaisseaux et les tissus endommagés; des chimokines permettant de recruter des cellules T régulatrices et la sécrétion de MMP pour le remodelage tissulaire. Adapté de (49)

Les macrophages de type M2 sont différents tant au niveau de leurs molécules de surface que de leurs fonctions. Ils sont induits par des cytokines de type 2 comme l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β . Les macrophages M2 seraient surtout impliqués dans la résolution de l'inflammation après la réaction inflammatoire. Ils ont une moins grande capacité de présentation d'antigènes que les M1 (52). Ils diminuent l'activation de la réponse immune adaptée par les lymphocytes Th1 via l'IL-10. Ce sont en outre de pauvres producteurs de dérivés oxygénés. Leur métabolisme repose sur l'arginase qui mène à la production d'ornithine et de polyamines préférentiellement (54). Le concept de polarisation ne veut cependant pas dire que les cellules restent dans un état fixe. En effet, ils peuvent changer de phénotype tout dépendant des conditions du milieu environnant, c'est-à-dire, pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires.(57) Il faut donc considérer que la population de macrophages est dynamique et non pas statique.

1.3.2 Les polymorphonucléaires et inflammation

La réaction inflammatoire a pour but de perméabiliser le tissu lésé ou infecté et ce, pour favoriser l'action des cellules inflammatoires résidentes, mais aussi pour permettre le recrutement de nouvelles cellules provenant de la circulation. Les toutes premières cellules à s'activer lors d'une infection sont les neutrophiles (56). Ils sont attirés par chimiotactisme au site inflammatoire par des chémokines (IL-8, *macrophage inflammatory protein-2*) ou des cytokines produites par le tissu environnant ou encore par des produits dérivés des micro-organismes envahissants tel que le LPS (55). L'importance du LPS pour initier le recrutement des neutrophiles lors d'infections bactériennes a d'ailleurs été démontrée chez des souris knock-out (KO) pour le récepteur CD14 (récepteur du LPS). L'influx de neutrophile était diminué, leur activation retardée et les souris finissaient par succomber (58). Ces études montrent l'importance des neutrophiles dans l'initiation de l'inflammation. Ils peuvent phagocyter les pathogènes et les débris cellulaires dans des vésicules qui fusionneront avec des granules qui contiennent des enzymes protéolytiques, comme le lysozyme; des peroxydases et des gélatinases (59). Le lysozyme est une protéine qui catalyse l'hydrolyse des glycoaminoglycanes bactériens, détruisant ainsi la paroi bactérienne. La peroxydase catalyse la formation de peroxyde d'hydrogène qui attaque la structure de la paroi

bactérienne. Les gélatinases quant à elles dégradent le collagène et permettent la destruction des fragments cellulaires ingérés dans les granules.

1.3.3 Les lymphocytes Th

Bien qu'ils ne constituent pas des cellules inflammatoires à proprement parler, les lymphocytes Th peuvent appuyer la réponse inflammatoire lorsqu'ils sont activés adéquatement en réponse à une APC (60). Lors de la rencontre entre une cellule Th naïve et une APC compatible, deux possibilités qui dépendront de la nature de l'antigène et des cytokines présentes peuvent survenir. La cellule peut se différencier en cellule effectrice ou en cellule mémoire. Les cellules effectrices se divisent en deux sous-types suivants : Th1 ou Th2 (voir figure 1.5). Les cellules Th1 sont principalement impliquées dans le soutien de la réponse inflammatoire par les APC à la suite de la sécrétion d'INF- γ , leur principale cytokine (61). En ce sens on peut considérer les Th1 comme pro-inflammatoires. Ils favorisent la phagocytose et la cytotoxicité des macrophages via la production d'INF- γ .

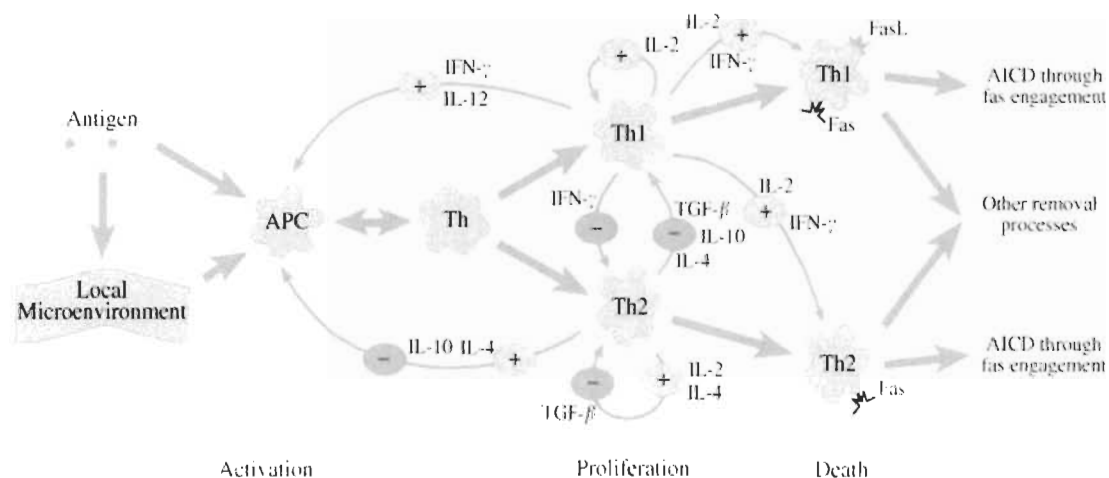


FIGURE 1.5 Différenciation des cellules Th lors de la rencontre avec une APC.

Après le contact avec l'APC, la cellule T naïve débute la différenciation qui dépend des signaux de co-stimulation (provenant des APC) et des cytokines présentes dans le milieu environnant. Les flèches indiquent la rétroaction des cytokines sécrétées par les cellules T différenciées sur les APC. Les cytokines dérivées des cellules Th1 comme l'INF- γ et l'IL-12 accroissent la toxicité des APC pour leur cible et inhibent la différenciation en Th2. Inversement, lorsque la différenciation se polarise vers les Th2, ces dernières sécrètent de l'IL-10 et de l'IL-4 qui en retour inhibent les Th1 et inhibent les APC. AICD = activation-induced cell death. Tiré de (61)

Le phénotype des cellules Th2 est différent, tant au niveau des fonctions et des sécrétions. Elles produisent des cytokines de type 2 telles que l'IL-4 et l'IL-10 qui sont capables de polariser le phénotype des macrophages en M2 tel que discuté plus tôt. Les cytokines produites par les Th2 aident à l'activation des lymphocytes B et donc participent à l'immunité humorale (62). Les Th2 sont également indispensables lors d'infections parasitaires (63).

CHAPITRE 2

2 Structure et fonction de l'endomètre

2.1 L'Endomètre

L'endomètre est la couche la plus interne de l'utérus. Elle se subdivise en deux couches principales : la couche fonctionnelle et la couche basale qui reposent toutes les deux sur une couche musculaire, le myomètre (figure 2.1). La couche fonctionnelle est un épithélium de type prismatique unistratifié. Il est constitué de glandes ainsi que de tissus conjonctifs comme tout épithélium (64). Cet épithélium va se détacher de la couche basale à la fin de chaque cycle menstruel lorsqu'il n'y a pas de fécondation. La couche basale restant intacte, elle assumera la régénération de la couche fonctionnelle suite aux menstruations. La couche musculaire quant à elle permettra à l'utérus de supporter la dilatation des tissus lors de la grossesse. Par ailleurs, le myomètre participe activement à la parturition en se contractant pour permettre la sortie du fœtus.

L'endomètre assume la fonction de reproduction en permettant à l'embryon de s'attacher à la paroi utérine et se développer. Ces cellules sont soumises à l'influence des hormones sexuelles qui agissent : a) en stimulant la différenciation des cellules basales en épithélium endométrial; b) en maintenant l'endomètre prêt à l'implantation pendant un certain temps, appelé fenêtre d'implantation. Si aucune fécondation ne se produit, le taux de progestérone va chuter, conséquence de l'involution du corps jaune et l'endomètre va entrer en phase menstruelle. Différentes explications ont été proposées pour comprendre les mécanismes impliqués dans les menstruations. Une théorie vasculaire a été décrite par Markee en 1940. Il a observé que la diminution du taux d'hormones sexuelles entraînait une vasoconstriction des artérioles suivie d'une vasodilatation juste avant le saignement. Il en a conclu que les cellules mourraient par anoxie (66). Cependant, des études subséquentes ont mis en évidence que les MMPs seraient impliquées dans le processus. En effet, la chute de progestérone entraînerait une levée de l'inhibition des MMPs qui favoriserait la dégradation de la matrice endométriale (67). Une étude de Marbaix *et al.* dans laquelle ils ont étudié des explants de cellules endométriales humaines a montré que l'inhibition des MMPs par différents inhibiteurs n'entraîne aucune modification à la structure des fibres argyrophiliques (qui contiennent des ions zinc) riche en collagène de la matrice endométriale comparé aux cellules contrôle incubées sans inhibiteur, où les fibres étaient dégradées (68). Notons que l'expérience était menée en absence de progestérone qui normalement lève l'inhibition des MMPs. Ces résultats soutiennent donc davantage l'implication des MMPs dans le processus de menstruation.

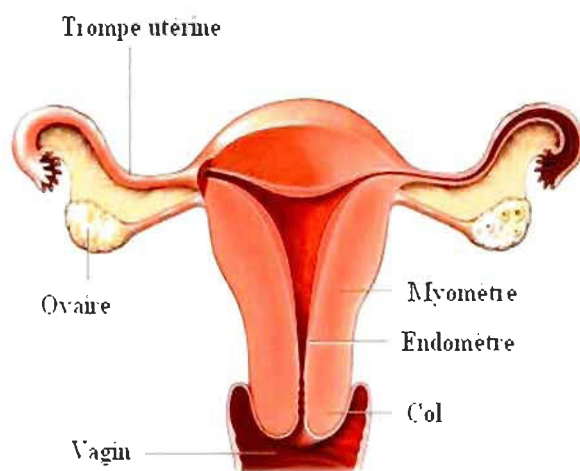


FIGURE 2.1 Structure de l'utérus.

L'utérus est composé de plusieurs structures : les ovaires, les trompes utérines, le myomètre, l'endomètre, le col et le vagin. La présence d'une couche musculaire épaisse permet la distension lors de la grossesse. L'endomètre procurera un lieu de nidification pour l'ovule fécondée auquel le placenta s'insérera. Image adaptée de (65)

Lorsque l'endomètre s'est détaché et a été éliminé, le cycle peut reprendre avec différenciation et prolifération de la couche basale. Il est à noter qu'un tel niveau de remodelage tissulaire cyclique est unique dans l'organisme. Les menstruations sont donc considérées comme un processus assimilable à une inflammation chronique telle que décrite précédemment.

La principale fonction de l'endomètre est de permettre et soutenir l'implantation embryonnaire qui est la première étape dans l'établissement de la grossesse. Il s'agit d'une étape indispensable qui doit être régulée étroitement. Des problèmes à ce niveau résultent souvent en un défaut d'implantation car les conditions requises sont multiples et réunies seulement pendant un court laps de temps (70). Lorsqu'il y a fécondation de l'ovule, on appelle la cellule résultante le zygote. Il s'agit d'un ovule fécondé qui se divisera pour donner naissance à des cellules encore non différenciées. Il continuera ses divisions dans la trompe utérine et se différenciera en blastocyste qui contient environ une centaine de cellules (figure 2.2). Ce stade de développement est constitué de deux masses de cellules distinctes, l'embryoblaste, la plus interne, qui donnera l'embryon et le trophoblaste, externe, qui donnera le placenta. Le blastocyste perdra son enveloppe nommée zone pellucide et il se dirigera alors vers la cavité utérine pour l'implantation au bout d'environ 4 à 5 jours après fécondation (71).

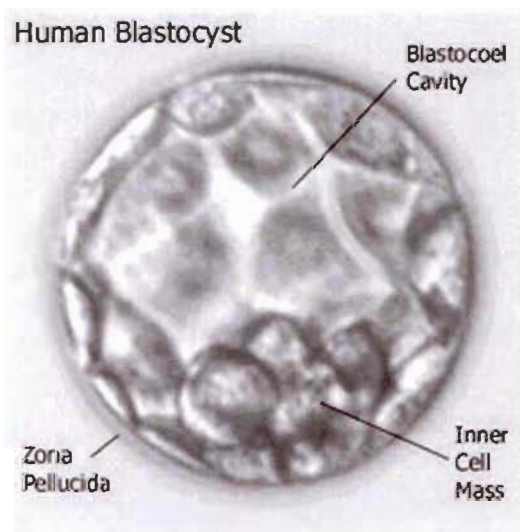


FIGURE 2.2 Blastocyste humain.

Composé d'une centaine de cellules différenciées en deux masses : interne (embryoblaste) et externe (trophoblaste). Il est entouré d'une zone pellucide qui se rompra pour laisser les cellules sortir lors de la blastulation. Ces dernières s'accrocheront à l'endomètre et s'y inséreront. Par la suite, les projections des trophoblastes dégraderont l'épithélium pour se diriger vers le stroma cellulaire. Il y aura formation d'une interface foeto-

À ce stade, le blastocyste est dit polarisé car l'embryoblaste est situé à l'un des deux pôles. Une fois à la surface de l'endomètre, un processus d'alignement orientera le pôle embryonnaire correctement sur l'endomètre. Le blastocyste débutera alors son invasion de la muqueuse utérine en dégradant la matrice cellulaire et en étendant ses prolongements cytoplasmiques dans le stroma endométrial pour former des liens avec la matrice (71). Les trophoblastes feront partie intégrante de l'interface foeto-maternelle du côté embryonnaire.

Pour bien accueillir l'embryon, l'endomètre doit nécessairement s'adapter. Qu'il y ait fécondation ou non, les cellules stromales de l'endomètre vont entreprendre un processus appelé décidualisation (72). Cela débute au cours de la phase sécrétoire du cycle sous l'influence des hormones et des cytokines et se poursuivra durant l'implantation. Ce processus entraînera des changements au niveau : des glandes utérines qui proliféreront; des vaisseaux sanguins qui se développeront pour établir une vascularisation adéquate; des cellules stromales qui prendront une morphologie pavimenteuse; des populations de cellules immunitaires qui s'infiltreront au sein des tissus.

La principale fonction des cellules déciduales est de créer l'interface foeto-maternelle du côté utérin et de contrôler l'infiltration des trophoblastes pour éviter une prolifération et une infiltration exagérée. Une étude récente par micropuce a mis en évidence que les trophoblastes eux-mêmes agissent sur les cellules déciduales. Les chercheurs ont étudié les effets des facteurs solubles produits par les trophoblastes sur des cellules déciduales en culture (73). Après la décidualisation *in vitro* de cellules stromales endométriales avec de la progestérone, ils ont soumis les cellules résultantes à du milieu conditionné de trophoblastes 0, 3 et 12h. Ils ont déterminé que 1374 gènes étaient induits et que 3443 étaient diminués. Parmi les gènes les plus fortement induits par les milieux conditionnés (MC) de trophoblastes, il y avait IL-8, IL-6, ainsi que plusieurs MMP tel que MMP-1, MMP-10 et MMP-14. Parmi les plus diminués, ils ont observé plusieurs facteurs de croissance comme le *insuline-like growth factor-1* (IGF-1), *fibroblast growth factor-1* (FGF-1) et le TGF- β 1. Cette étude démontre donc une influence importante du

trophoblaste sur la décidualisation lors de l'implantation favorisant, selon les auteurs, un environnement immunitaire adéquat à l'implantation dans la décidue tout en limitant la prolifération des cellules stromales durant la phase d'implantation.

2.2 Population leucocytaire de l'endomètre

Tous les événements requis pour préparer l'endomètre et permettre l'implantation requièrent l'action de différents médiateurs : prostaglandines, cytokines, hormones, etc. Cependant, on a observé depuis longtemps que l'endomètre, comme la plupart des tissus, est infiltré par différentes populations de leucocytes qui participent étroitement à son homéostasie mais aussi à toutes les étapes de la grossesse (74). Le tableau 2.1 montre les différentes populations de cellules immunitaires qui sont présentes dans l'endomètre au cours du cycle selon Salamonsen *et al* (75). Il n'est peut-être pas surprenant de constater que les cellules de l'immunité innée sont les plus présentes dans le tissu endométrial, particulièrement lors des menstruations. En effet, tel que mentionné plus haut, l'endomètre représente un exemple de milieu inflammatoire chronique où ces cellules jouent un rôle très important. Une des populations de leucocytes fortement présentes au sein des cellules déciduales sont les cellules NK.

Au niveau endométrial, ces dernières sont d'un type particulier. Elles possèdent des granules qui contiennent des enzymes comme des granzymes, et des perforines qui leur confèrent donc un phénotype cytotoxique similaire aux lymphocytes Tc (76). Contrairement aux lymphocytes Th et Tc, elles n'expriment pas de CD3, et elles n'expriment pas non plus le récepteur CD16 typique des cellules NK provenant du sang périphérique (77). Ces caractéristiques expliquent leur appellation de cellules NK utérines ou uNK pour bien marquer leurs différences. On ne sait pas encore avec précision leur fonction, mais des évidences suggèrent qu'elles sont impliquées dans le développement des artérioles qui alimenteront le fœtus, au niveau de la décidue (78). Cependant, on n'a pas encore démontré jusqu'à maintenant de rôle décisif des cellules uNK dans la physiologie utérine, bien que l'on puisse soupçonner que leur présence dans les tissus n'est pas fortuite et indique à priori qu'elles exercent des fonctions importantes.

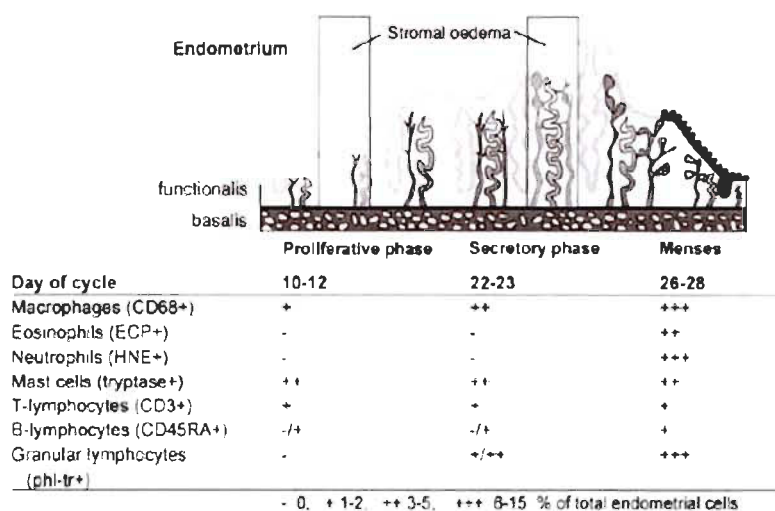


TABLEAU 2.1 Distribution des leucocytes endométriaux selon les phases du cycle menstruel. Les mastocytes sont uniformément présents durant toutes les phases avec une abondance d'environ 3-5%, les macrophages sont également présents à toutes les phases avec une augmentation notable à 6-15% lors des menstruations. Pour les neutrophiles/éosinophiles, on les retrouve essentiellement aux jours 26-28. Les lymphocytes T et B ne représentent qu'environ 1-2% des cellules totales. Tiré de (75)

On retrouve des éosinophiles/basophiles dans les tissus endométriaux, bien que leur proportion ne soit pas aussi grande que les uNK ou les macrophages (75). Cependant, leurs fonctions précises au niveau de la physiologie utérine ne sont pas encore très connues. Leur présence résulte vraisemblablement de la réaction inflammatoire du tissu. Parmi les leucocytes utérins d'importance, les macrophages jouent un rôle prépondérant dans les fonctions reproductives. Ceci a été démontré chez des souris homozygotes possédant une mutation inactivant le récepteur du *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) principal inducteur de la différenciation des monocytes en macrophages (79). Les chercheurs ont observé que les souris $Csfm^{op}/Csfm^{op}$ avaient un cycle oestral allongé; une diminution, quoique prévisible, de la population de macrophages et une puberté retardée. Les souris demeuraient fertiles mais avaient des portées diminuées voire nulles lors d'accouplement avec un mâle homozygote pour la même mutation. Cependant, le croisement avec un mâle hétérozygote compensait la perte de fertilité démontrant qu'un apport externe de M-CSF via le liquide séminal du mâle était suffisant pour combler le manque maternel. Ces résultats sont cependant nuancés car le récepteur du M-CSF n'est pas uniquement présent sur les monocytes mais aussi sur les ovocytes et

les cellules déciduales, ce qui rend l'interprétation des résultats délicate.

On croit que les macrophages utérins seraient impliqués dans les menstruations par leur sécrétion de MMP (80). Une étude où l'on a stimulé des monocytes avec l'INF- γ ou le LPS a montré que MMP-3 était induit (81). Une autre étude a mis en évidence que les cytokines/facteurs de croissance comme le TNF- α , le M-CSF, le VEGF, le bFGF et le PDGF ont tous induit MMP-13 (82). À la lumière de ces études, on constate que les macrophages utérins produisent les molécules clés pour la dégradation de la matrice endométriale lors des menstruations. De plus, l'infiltration de tissu endométrial par une majorité de macrophages lors des menstruations démontre leur importance (75).

Les macrophages utérins participent activement à l'élimination des corps apoptotiques au niveau du site d'implantation (83). En effet, l'apoptose des cellules déciduales est nécessaire pour le bon développement des trophoblastes et de l'interface fœto-maternelle car l'organisme doit bien contrôler l'infiltration de l'embryon dans la matrice endométriale. Le déclenchement de l'apoptose au niveau des cellules trophoblastiques est entre autre dépendant de la voie du Fas (84). Le Fas est un récepteur de mort cellulaire induite. Il est présent sur la plupart des cellules de l'organisme et fait partie de la famille des récepteurs au TNF. La liaison de Fas avec son ligand induit chez la cellule l'activation de la procaspase-8 qui en retour activera en cascade d'abord les caspases-3, et ensuite les caspases-6 et caspases-7 (85). Les caspases sont des protéines qui déclenchent l'apoptose des cellules. On a démontré une expression du Fas sur les cellules trophoblastiques et ce, tout au cours de la grossesse (86). On a démontré que durant les premiers mois de la grossesse, les cellules déciduales montent une intense activité apoptotique (87, 88). En outre, on a montré que durant la gestation, on trouve une grande quantité de macrophages à l'interface fœto-maternelle au niveau de la décidue et du placenta ce qui suggère leur importance dans le phénomène de contrôle de l'infiltration des trophoblastes (89). Une étude *in vitro* sur des cellules cytotrophoblastiques (Jar et JEG-3) et des macrophages a montré que ces derniers expriment plusieurs cytokines et ligands de la famille du TNF et peuvent donc réguler l'apoptose des trophoblastes (90). En plus d'éliminer les débris cellulaires, des études

ont montré que les macrophages qui ont ingéré des corps apoptotiques vont libérer du TGF- β qui exerce un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur (91, 92). Ces observations pourraient expliquer, en partie, l'immunotolérance aux antigènes fœtaux, phénomène très étudié qui demeure encore mal compris à ce jour.

2.3 Cytokines et chémokines dans l'environnement endométrial

Le tissu endométrial est un milieu riche en médiateurs chimiques de toutes sortes. Outre les hormones et les prostaglandines dont les rôles sont étudiés depuis longtemps, il existe plusieurs autres médiateurs comme les cytokines et les chémokines qui jouent un rôle tout aussi fondamental. Plusieurs cytokines ont été identifiées dans l'endomètre que ce soit durant le cycle menstruel, lors de l'implantation, de la grossesse ou de la parturition. Quelques unes de ces molécules sont présentées avec leur importance dans la physiologie utérine.

Durant le cycle menstruel, les monocytes circulants sont recrutés dans les tissus sous l'action d'une chémokine, le *macrophage chemoattractant protein-1* (MCP-1). Des études par immunohistochimie montrent que MCP-1 peut se retrouver au niveau des cellules épithéliales et déciduales (93). D'autres chercheurs ont localisé MCP-1 au pourtour des vaisseaux sanguins (94). L'endomètre contient donc des facteurs capables de mobiliser les monocytes dans les tissus.

2.4 M-CSF et GM-CSF

Parmi les cytokines présentes dans l'endomètre, il y a le M-CSF et le granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Ces cytokines sont critiques pour initier la différenciation du monocyte en macrophage mature. Des études ont mis en évidence la présence de M-CSF dans les cellules épithéliales durant la phase sécrétoire du cycle, dans les cellules déciduales et le placenta (95-97). Une étude récente a montré une induction de M-CSF dans les cellules déciduales par l'IL-1, le TNF- α et l'estrogène (98). Le GM-CSF, une cytokine hématopoïétique, a été détecté par plusieurs études dans les cellules épithéliales glandulaires et stromales de l'endomètre (99, 100). Le GM-CSF

est le point de pivot capable de moduler la destinée autant des cellules granulocytaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) que myélocytaires (monocytes/macrophages et dendritiques). Il peut agir comme chémokine, favoriser l'adhésion des leucocytes aux parois endothéliales, promouvoir la cytotoxicité, la phagocytose, l'apprêtement des antigènes et même induire l'immunité anti-tumorale (101). Le GM-CSF est critique dans le développement du placenta chez les souris. En effet, des études chez les souris nulle pour le GM-CSF ont montré une altération du développement du trophoblaste au niveau des artérioles spiralée, résultant en des portées diminuées, et une survie des souriceaux réduite (102). En somme, le GM-CSF est très impliqué dans la régulation des fonctions endométriales, tant au niveau de l'implantation que du développement de l'embryon. Il contribue également au développement des populations de leucocytes endométriaux (103).

2.5 Leukemia inhibitory factor (LIF)

Le *leukemia inhibitory factor* (LIF) a été découvert comme une cytokine capable d'induire la différenciation et d'inhiber la prolifération d'une lignée myéloïde M1 chez la souris en 1988 (104). Le LIF est une glycoprotéine de 38-67 kDa tout dépendant du niveau de glycosylation de la protéine qui elle-même est de 20 kDa (104). Le LIF est reconnu pour ses actions pléiotropiques sur plusieurs tissus d'origine différente. Depuis sa découverte, peu d'études ont été entreprises sur le LIF au niveau de la reproduction, particulièrement chez la femme. Les connaissances actuelles proviennent d'études chez les souris. Le LIF fait partie de la même famille que l'IL-6, l'*oncostatin M* (OSM), et le *cardiotrophin-1* (CT-1) qui signalent toutes via une sous-unité commune nommée gp130. Des études suggèrent que LIF peut être induit par l'IL-1, le TNF- α ou le TGF- β (105, 106). Une des fonctions reconnues du LIF est de permettre l'implantation embryonnaire. En effet, on a démontré que le LIF était absolument nécessaire pour une implantation du blastocyste chez les souris (107-110). Des souris knock-out pour le LIF ont montré des défauts de décidualisation et d'implantation continus résultant en une infertilité totale (109). De plus, on a mis en cause un défaut d'expression du LIF dans des cas d'infertilité chez la femme bien que peu d'études chez l'humain soient encore disponibles (111, 112). Dans une de ces études, on a localisé par immunohistochimie le

LIF de façon prédominante au niveau de l'endomètre et très peu au niveau du stroma chez les femmes fertiles. L'expression maximale du LIF survient durant la phase lutéale. Chez les femmes non fertiles, l'expression était diminuée. Chez les mâles, une absence de LIF affecte de façon prédominante la production de spermatozoïdes au niveau des tubules séminifères (113).

2.6 Cytokines pro-inflammatoires

L'endomètre est une source de plusieurs cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α . L'IL-6 joue plusieurs fonctions dans l'initiation et la régulation de la réponse inflammatoire aiguë. Au niveau de l'endomètre, on retrouve l'IL-6 dans les cellules épithéliales et stromales (114). On a suggéré que l'IL-6 pouvait contribuer à la croissance du trophoblaste et le développement du placenta (115). Pour le TNF- α , il serait impliqué dans les menstruations car on observe une augmentation de la sécrétion de TNF dans la phase sécrétoire (116). De plus, une étude *in vivo* chez la souris a montré que la baisse du taux d'estrogène sérique survenant durant la phase sécrétoire corrélait avec l'expression de l'ARNm du TNF- α et sa synthèse. Les auteurs ont évoqué un mécanisme de levée d'inhibition de l'expression par la baisse d'estrogène, bien que l'étude ne conclue pas quel mécanisme est en jeu dans le phénomène (117). Ils ont de plus montré un effet autocrine du TNF- α sur sa propre synthèse.

Plusieurs autres cytokines comme l'IL-4, l'IL-10, le TGF- β , l'IL-11 ou l'INF- γ ont toutes été détectées dans les tissus endométriaux (118-121). Connaissant le rôle de l'INF- γ , l'IL-4 et de l'IL-10, qui sont capables de polariser les macrophages vers un phénotype M1 ou M2, on peut considérer que la population des macrophages utérins est très dynamique et se modifie constamment en réponse aux stimuli locaux. On considère cependant que l'environnement endométrial renfermerait majoritairement, lors des grossesses, des cytokines de type 2, c'est-à-dire anti-inflammatoires et immunosuppressives. Ceci s'expliquerait par le besoin d'avoir un milieu à la fois immunologiquement efficace tout en maintenant une tolérance aux antigènes fœtaux (122, 123).

CHAPITRE 3

3 Inflammation et cancer

3.1 Inflammation et pathologies humaines

L'inflammation, bien que bénéfique, peut devenir un état pathologique lorsqu'elle est soutenue et devient chronique. En effet, Virchow (130) a observé il y a déjà un siècle que les tumeurs étaient infiltrées par des cellules immunitaires et a émis l'hypothèse que l'inflammation chronique était probablement déterminante dans la progression du cancer. Ses observations trouveront une confirmation avec la découverte, plus récemment, que plusieurs maladies humaines sont associées à une inflammation chronique (tableau 3.1). Des relations ont pu être établies pour confirmer cette

TABLEAU 3.1
Maladie inflammatoires ou infectieuses associées à un risque accru de développer un cancer

Maladie	Organe	Références
Maladie de Crohn	Intestin/colon	(124, 125)
Colite ulcéraives	Colon	(126)
Hépatite virale (B et C)	Foie	(127, 128)
Infection à <i>Helicobactère pylori</i>	Estomac	(129)

hypothèse, par exemple, pour le lupus érythémateux disséminé (131), l'athérosclérose (132, 133) et l'arthrite rhumatoïde (134, 135). Ces pathologies sont toutes reliées à une inflammation chronique qui détruit les tissus en favorisant une infiltration de cellules immunocompétentes et en altérant le comportement des cellules environnantes.

Ces observations amènent à s'interroger sur l'impact de l'inflammation chronique sur le développement ou du moins sur la progression tumorale. Ces maladies sont caractérisées par une activation soutenue et non régulée du système immunitaire. Les liens entre l'inflammation chronique et la transformation néoplasique sont multiples. La présence continue de produits réactifs de l'oxygène et de dérivés azotés peut induire plusieurs dommages cellulaires. En effet, la présence d'un milieu très oxydant favorise l'apparition de mutations dans l'ADN (136), l'activation d'oncogènes; des modifications d'ordre épigénétiques (137) et même des altérations post-traductionnelles qui engendrent des altérations néfastes pour le fonctionnement des protéines. Il a été démontré que l'oxyde nitrique (NO) pouvait induire des modifications post-traductionnelles importantes qui inactivent le gène p53 avec les conséquences qui en découlent : perte de contrôle du cycle cellulaire et l'accumulation de mutations dans l'ADN (138). Le NO induirait la nitration des résidus tyrosines de p53, modifiant sa conformation et donc sa capacité de liaison à l'ADN.

3.2 Inflammation et cancer endométrial

De tous les cancers gynécologiques, le cancer de l'endomètre est le plus prévalant. On le rencontre principalement chez les femmes occidentales post-ménopausées. Au Canada, ce sont les tumeurs malignes de l'utérus les plus fréquentes avec 43% des cancers gynécologiques (139). Des données épidémiologiques accumulées depuis plusieurs années établissent un lien entre le cancer de l'endomètre et un déséquilibre entre œstrogène et progestérone (140). Cette hypothèse trouve son explication dans les facteurs de risques associés au cancer endométriale. Le tableau 3.2 montre des exemples de liens possibles entre le déséquilibre hormonal et l'inflammation qui y est associée.

L'inflammation est considérée comme un facteur de risque pour le développement des cancers. On a montré qu'une administration chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) diminuait de beaucoup le risque de développer certains cancers (142-146). Une explication possible est que les NSAID, inhibant la cyclooxygénase, diminuent l'exposition des cellules aux prostaglandines, réduisant ainsi la tendance à l'inflammation. L'endomètre étant un milieu soumis à un remodelage intense causant une inflammation quasi chronique, on y retrouve de grandes quantités de cytokines

TABLEAU 3.2
Facteurs de risques associés au cancer endométrial et leur correspondance inflammatoire

	Théorie du déséquilibre hormonal	Théorie inflammatoire
Facteurs de risques		
Thérapie oestrogénique seule	Stimulation par l'œstrogène non compensée par progestérone	La présence d'œstrogène augmente l'inflammation endométriale
Obésité	Augmentation de l'exposition aux oestrogènes par aromatisation des androgènes au niveau périphérique	
Premières menstruations précoces	Augmentation de l'exposition de l'endomètre aux œstrogènes durant la vie	Augmentation du nombre de menstruations, augmentation des réactions inflammatoires au cours de la vie
Syndrome des ovaires micropolykystiques	Augmentation de l'exposition aux oestrogènes/androgènes	Augmentation de l'inflammation systémique
Anovulation	Augmentation du ratio œstrogène/progestérone dans l'endomètre	La diminution de la progestérone augmente l'inflammation
Ménorragie	Pas de facteur évident	Augmentation des menstruations = inflammation accrue
Facteurs protecteurs		
La grossesse	Augmente l'exposition à la progestérone	- Diminue le nombre de menstruation, donc diminue les épisodes d'inflammations - Effet anti-inflammatoire de la progestérone
Contraceptif oral	Augmente l'exposition à la progestine	Effet anti-inflammatoire de la progestine

progestine = forme synthétique de la progestérone; Adapté de (141)

inflammatoires. Ces cytokines induisent la division cellulaire ainsi que la production de radicaux libres qui peuvent entraîner des dommages à l'ADN (136). Il est donc raisonnable de croire que l'hypothèse d'un déséquilibre hormonal puisse en réalité être la cause indirecte du cancer et ce, en modifiant l'équilibre entre les facteurs pro et anti-inflammatoires dans l'environnement endométrial et en induisant des transformations au niveau de l'ADN. La figure 3.1 résume les mécanismes proposés pour expliquer les facteurs de risques inflammatoires associés au cancer endométrial. Certains facteurs comme l'obésité, l'âge avancé et le diabète favorisent l'inflammation. D'autre part, des facteurs comme les contraceptifs oraux qui contiennent de la progestérone, et les grossesses multiples sont défavorables à l'inflammation locale et protègent à long terme.

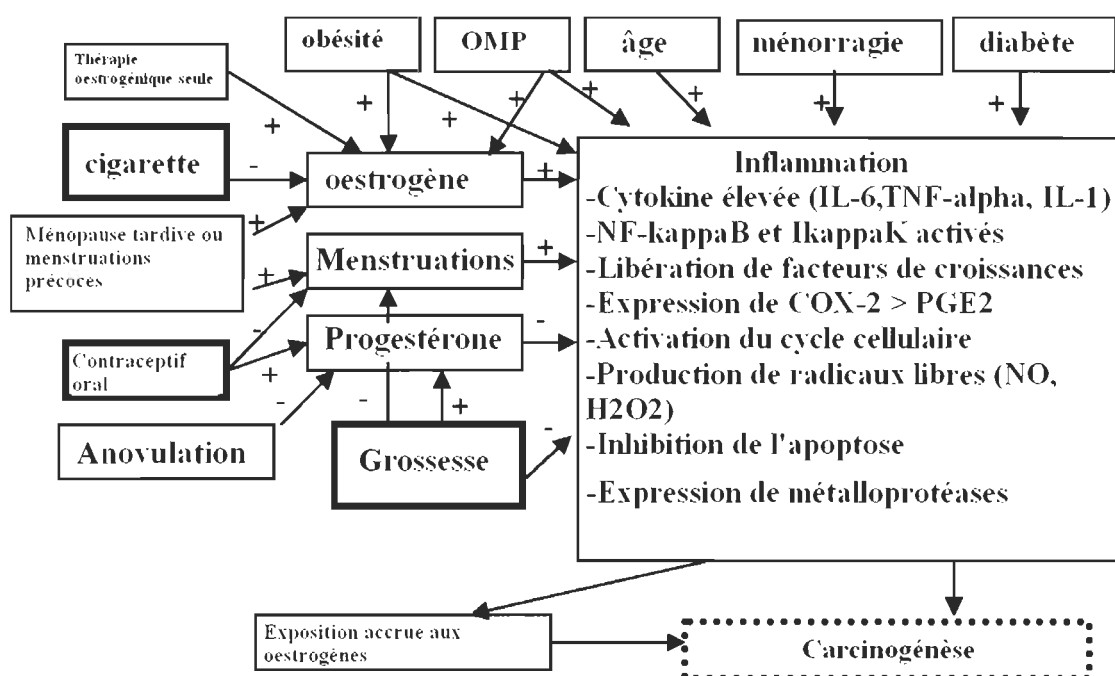


FIGURE 3.1 Relation entre le déséquilibre hormonal, les facteurs de risque et de protection dans l'inflammation associée au cancer endométrial. Les facteurs protecteurs (grossesse et contraceptifs oraux) agissent en favorisant une production de progestérone qui en retour diminue la réponse inflammatoire. Au contraire, les facteurs de risques concourent tous à favoriser une augmentation de la sécrétion d'oestrogène au détriment de la progestérone. OMP = ovaires micropolykystiques. Adapté de (141)

3.3 Facteurs de transcription et voies de signalisation dans les cancers

3.3.1 Facteurs de transcription NF- κ B

Des données récentes indiquent que les facteurs de transcription de la famille du *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) seraient le lien entre la carcinogenèse et l'inflammation (147, 148). Cette famille est constituée de plusieurs membres : p65 (RelA), RelB, p50, p52. Cependant, les plus communs sont p65 et p50 (147). Les membres de la famille de NF- κ B sont des facteurs de transcription régulant l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (149). Ils inhibent l'apoptose, stimulent le cycle cellulaire et favorisent l'angiogénèse via la synthèse de VEGF (150). Les cytokines inflammatoires présentes dans l'endomètre pourraient jouer un rôle déterminant dans l'activation de NF- κ B. Des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , la présence de réactifs de l'oxygène (151) ou encore la baisse de progestérone (152) peuvent mener à l'activation de NF- κ B. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires agissent via la phosphorylation du *inhibitor of IkappaB kinase complexe* (IKK). Ce dernier, une fois phosphorylé, sera transporté au noyau où il pourra inhiber I κ B, l'inhibiteur naturel de NF- κ B. Ceci résultera en l'activation d'une foule de gène pro-inflammatoires ainsi que l'induction de la prolifération (153). Une étude par immunohistochimie sur les cellules de carcinome endométrial 95 a montré que plusieurs membres de NF- κ B étaient présents et activés dans les cancers endométriaux (154) ce qui supporte l'implication de ce facteur de transcription dans la carcinogenèse associée à l'inflammation. En somme, les conséquences de l'activation des complexes NF- κ B sont importantes au niveau du contrôle du cycle cellulaire mais aussi de l'inflammation et ils sont donc considérés comme cruciaux dans le développement des cancers dont les cancers endométriaux. De plus, cette famille de facteurs de transcription est centrale dans la coordination de la réponse immunitaire et peut être activée de plusieurs manières, par exemple, l'activation du récepteur CD40 (155), ou l'activation des lymphocytes B par leur récepteur-anticorps de surface lorsqu'ils rencontrent leur antigène (156) ou encore par la signalisation via les TLRs lorsqu'ils rencontrent les pathogènes bactériens ou viraux (157).

3.3.2 Voie des JAK/STAT

Les cytokines inflammatoires agissent sur la transcription de gène via l'activation de facteurs de transcription. Elles peuvent agir autant sur les cellules hématopoïétiques que sur les cellules non-hématopoïétiques. Une des voies de signalisation majeure impliquée dans l'action des cytokines (plus d'une quarantaine) est la voie des STAT pour *signal transducer and activator of transcription*. La figure 3.2 montre un exemple de signalisation par les JAK/STAT. C'est une famille de facteurs de transcription qui comporte 7 membres connus. Comme leur nom l'indique, ces facteurs peuvent à la fois transmettre le signal des récepteurs vers le noyau et à la fois activer directement la transcription de gènes sans l'intervention de seconds messagers. Ils sont activés par la phosphorylation d'un seul résidu tyrosine généralement localisé près de la partie – carboxy terminale. Une fois phosphorylés, les monomères dimérisent via leur domaine Src homologue (SH-2) (158). Cette dimérisation révèle un site de liaison sur l'ADN de 9 paires de bases dans la zone régulatrice du gène. La découverte des STATs provient d'études sur la signalisation induite par les cytokines particulièrement les interférons α et β qui signalent via ces facteurs (159). Cependant, les récepteurs aux interférons ne possèdent pas d'activité kinase. Ainsi on a mis en évidence que les STATs étaient phosphorylés par les protéines de la famille des *janus activated kinase* (JAK) et depuis, cette voie est connue sous le nom de JAK-STAT (158).

Beaucoup d'intérêt s'est développé autour de ces facteurs de transcription. En effet, plusieurs études ont mis en évidence leur activation dans plusieurs types de cancers comme la leucémie aiguë mégakaryoblastique (160) le cancer de la prostate (161) le glioblastome (162) et celui du sein (163) entre autre. Cependant, un de ces facteurs, STAT3, semble plus impliqué dans la transformation néoplasique que tous les autres. Bromberg *et al.* ont élaboré un vecteur d'expression constitutivement actif de STAT3 qu'ils ont ensuite transfecté dans des fibroblastes. Ils ont observé que les fibroblastes étaient capables de former des colonies dans l'agar et induisaient des tumeurs dans des souris nues (164).

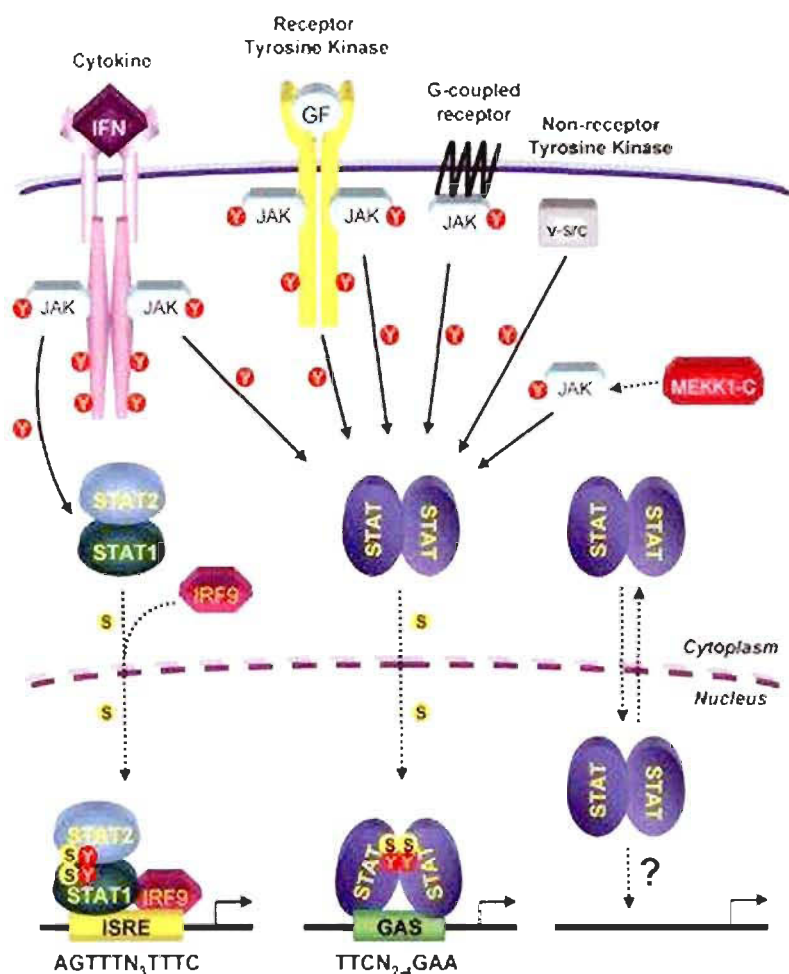


FIGURE 3.2 Exemple de signalisation par la voie JAK/STAT. Les facteurs de transcription STAT peuvent être activés par des cytokines ou des facteurs de croissance et ce via des récepteurs tyrosine kinase, des récepteurs couplés aux protéines G ou encore directement par des protéines adaptatrices intracellulaires (MEKK) qui activent les JAKs. En retour, les JAKs phosphorylent les monomères STATs. Une fois activés, les monomères vont s'associer en dimères et se diriger vers le noyau pour se lier à leurs éléments de réponse, ce qui permettra la transcription des gènes. L'exemple de l'INF- γ et STAT1 est présentée ici. Les protéines STATs se lient au *interferon-stimulated response element* (ISRE) et au *gamma-activated sequence* (GAS). L'activation des STAT est rapide, et de courte durée. On observe une accumulation maximale dans le noyau après environ 30 minutes et leur inactivation subséquente. Tiré de : (158)

Pour mieux comprendre comment STAT3 pouvait contribuer à la transformation néoplasique, des études par micropuce ont été effectuées. Il est bien établi que le développement des cancers dépend en partie d'une prolifération cellulaire incontrôlée. Or, on a établi que STAT3 augmentait l'expression de la cycline D1 dans les cellules de

carcinomes spinocellulaires (165). D'autre part, on sait que les cancers ont généralement une apoptose diminuée ou totalement compromise. Une étude où l'on a transfecté le gène de STAT3 actif constitutivement a induit une augmentation significative (le seuil considéré significatif était de 1.5 fois induit) de certains gènes anti-apoptotiques, notamment BcL-1, McL-1, BcL-x dans des lignées de fibroblastes de souris (166). La même étude a aussi démontré que STAT3 induit l'expression du VEGF qui favorise l'angiogénèse, processus indispensable au développement des tumeurs localisées et des métastases.

La voie des JAK/STAT est normalement active sur une courte période de temps. L'un des points importants est de savoir comment STAT3 peut être activé constitutivement dans les cancers. L'activation des STATs est inhibée par une famille de protéines nommée *suppressor of cytokines signaling* (SOCS). L'expression de ces protéines est elle-même induite par les STATs et forment donc une boucle de rétroaction négative. On en compte sept membres qui contiennent tous, à l'instar des STATs, des domaines d'homologie SH2 en leur centre. Les SOCS diffèrent par leur domaine amino-terminal variable. Cependant, elles possèdent une séquence de 40 aa. dans leur partie carboxy-terminale nommée la SOCS-box. Cette partie interagit avec elongin B et C qui permet de recruter le complexe ubiquitine E2 transférase qui mènera à la dégradation des protéines STAT dans les protéasomes (167, 168). La figure 3.3 résume la régulation de l'activation de STAT par les protéines SOCS/CIS.

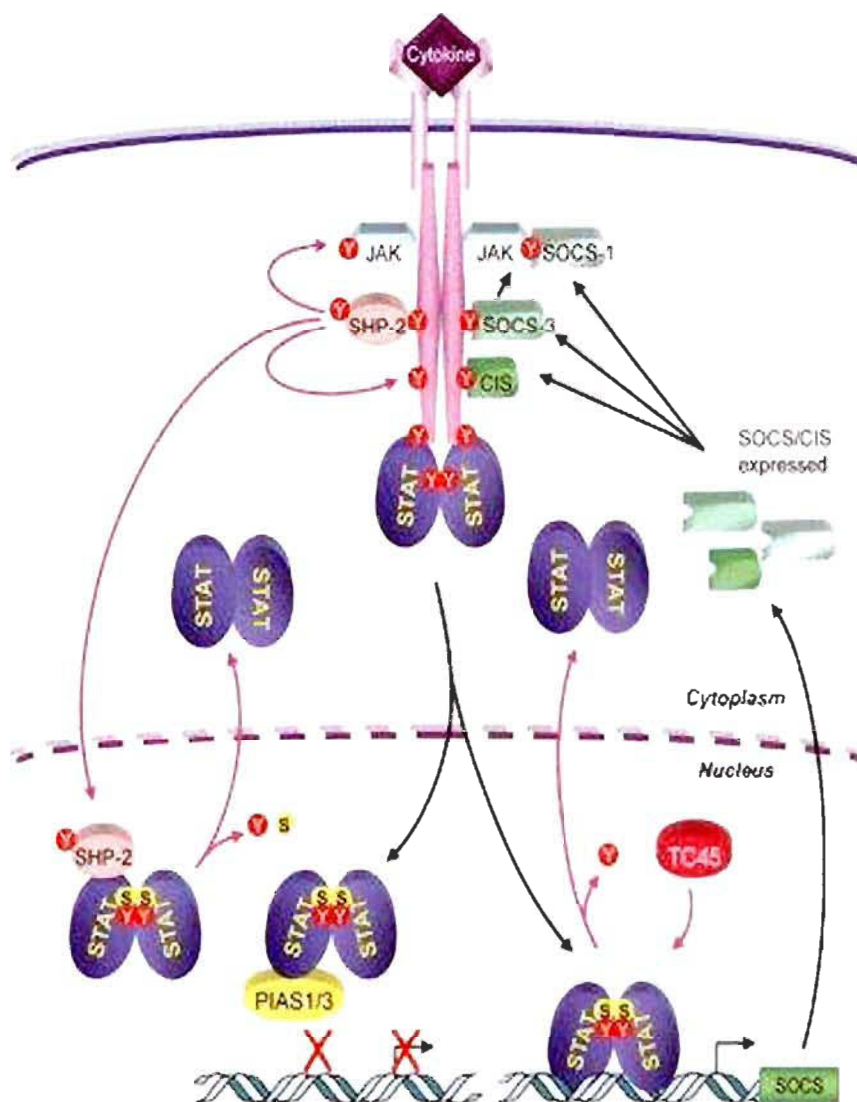


FIGURE 3.3 Régulation des STATs par les protéines SOCS. L'activation des STAT mènera à la transcription de plusieurs gènes dont certains seront impliqués dans le rétro-contrôle négatif de cette voie. Les protéines SOCS seront produites rapidement après l'activation de STAT. Les cytokines activent les récepteurs qui dimériseront et phosphoryleront JAK1. En retour, JAK1 phosphorylera la partie cytoplasmique du récepteur créant des sites de liaison non seulement pour les STATs mais aussi pour les protéines SOCS et CIS. Les protéines SOCS agissent à différents niveaux : elles peuvent se lier directement à la protéine JAK (cas de SOCS-1) ou interagir avec le récepteur phosphorylé et par la suite sur JAK (cas de SOCS-3). Certaines protéines comme la *cytokine-induced SH2 containing protein* (CIS) agirait comme pseudo-substrat pour les JAK, compétitionnant avec les sites de phosphorylation des STATs. Tiré de (158).

Une hypothèse pour expliquer l'activation constitutive de STAT3 serait que les mécanismes de rétrocontrôle, particulièrement par les protéines SOCS-1 et SOCS-3 puissent être inefficaces. Des études ont montré que les promoteurs de *socs-1* et *socs-3* étaient méthylés dans certains cancers des poumons, dans les adénocarcinomes de Barrett, dans les mélanomes malins (169-173), dans des cancers spinocellulaires (174) ou encore dans les carcinomes hépatocellulaires (173). Ces études ont conclu à une diminution de l'expression de SOCS-1 ou SOCS-3, par méthylation du promoteur. La méthylation est un des mécanismes épigénétiques. L'épigénétique est l'étude des modifications de l'expression des gènes qui ne résultent pas de mutations sur l'ADN des gènes ou leurs promoteurs. Les cellules utilisent ces mécanismes pour inactiver des gènes dont l'expression ne doit pas être induite dans un tissu donné de l'organisme, par exemple. Les cellules cancéreuses utiliseraient ces modifications pour activer ou inactiver certains gènes selon les besoins (175). Quoi qu'il en soit, les protéines régulatrices SOCS semblent impliquées, du moins en partie, dans le processus de perte de régulation de la voie JAK/STAT.

3.3.3 Voie p38/MAPK

La voie de signalisation p38 fait partie d'un groupe appelé les *mitogen activated protein kinase* (MAPK) qui inclut les *extracellular-regulated kinase* (ERK) et les *c-Jun N-terminal kinase* (JNK). La voie p38 est bien connue pour son implication lors de stress cellulaire, lors d'irradiation par les rayons ultraviolets ainsi que dans l'inflammation (176-179). On retrouve 4 isoformes de p38 chez les mammifères: p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Leur distribution est variable et leurs gènes cibles également. La voie p38 a d'abord été associée à l'inflammation. On l'a d'ailleurs découverte lors d'études sur l'inflammation où l'on a montré que p38 était requis pour l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 (180). On a également montré que la voie p38 était impliquée dans la réponse à certaines cytokines importantes pour la différenciation des cellules immunitaires comme le GM-CSF et le G-CSF (181, 182). De plus, une étude chez des souris traitées avec l'inhibiteur SB220025 a montré une action anti-inflammatoire dose-dépendante de l'inhibition de p38. Chez des souris soumises

aux endotoxines, les chercheurs ont observé que l'inhibition de p38 favorisait la survie des souris, comparée à celles non traitées par l'inhibiteur, dont la mortalité était plus élevée (183). Des études ont également établi que l'activation de p38 était nécessaire pour l'expression de l'iNOS (184, 185). D'autres études ont montré que p38 était important dans l'expression induite par le TNF- α des intégrines ICAM-1 et VCAM-1 dans des cellules de Sertolli (186)

Des études récentes ont mis en évidence un effet anti-tumoral suite à l'activation de p38. Xing Cao et ses collègues ont démontré que la l'activation d'AKT2/survivin via les fibronectines protégeait les cellules tumorales du cancer ovarien (A2780) et sein (MDA-MB-231) de l'apoptose induite par le docetaxel. Le docetaxel agit en inhibant l'activité des microtubules, empêchant ainsi les cellules de se diviser lors du cycle cellulaire. Ils ont démontré que cette résistance à l'apoptose était due à une inhibition de la voie p38, démontrant ainsi l'importance de l'activation de p38 dans l'induction de l'apoptose (187). Plusieurs mécanismes reliés à l'homéostasie cellulaire ont été proposés pour expliquer l'effet anti-tumoral de p38 comme par exemple : la sénescence induite par les oncogènes (188), la sénescence répllicative, l'inhibition de contact et la réparation des dommages à l'ADN (189). La sénescence est le processus par lequel une cellule normale qui arrive au bout de sa vie utile cessera de fonctionner pour éventuellement mourir par apoptose. Or, il arrive que l'expression soudaine d'un oncogène dans une cellule induise la sénescence. Un exemple bien connu est le cas de l'oncogène *ras*. Cet oncogène et ses protéines cibles en aval, comme *Raf-1*, stimulent l'activité de p38 qui favorisera la sénescence tel que démontré dans une étude sur des fibroblastes humains (190). Ils ont démontré que p38 était activé par Ras via l'action en cascade des voies MEK-ERK et que l'inhibition pharmacologique de p38 empêchait la sénescence. Ainsi, la voie p38 MAPK se révèle importante dans la régulation du cycle cellulaire, plus particulièrement dans l'initiation de la sénescence cellulaire.

Un autre mécanisme dans lequel p38 est impliqué est l'inhibition de contact. Dans un tissu normal, les cellules ne doivent pas proliférer lorsqu'elles sont entourées par d'autres cellules intactes. Lorsque cela se produit, la cellule subira une inhibition par

contact avec les cellules adjacentes. La perte de ce contrôle est une des caractéristiques requise pour la tumorigénèse. Une étude de *Faust et al* a montré que des fibroblastes en culture avaient un p38 α peu activé dans leur phase de croissance, contrairement aux cellules à confluence (191). L'équipe a également étudié les conséquences de l'inhibition soit pharmacologique soit par transfection avec un dominant négatif de p38 α . Les cellules traitées ont atteint une confluence plus grande que les cellules contrôles avec p38 α fonctionnel. Cependant, une autre étude (192) tout aussi récente arrive à des conclusions inverses, toujours dans des fibroblastes. En effet, ils ont montré que p38 α est activé dans des cellules de fibroblastes normaux en culture tout au long de la croissance, mais est diminué aussitôt la confluence atteinte contrairement à une lignée cancéreuse de fibrosarcome, les cellules HT-1080, dont l'activation de p38 était continue. Bien que contradictoire, ces résultats démontrent un rôle de p38 dans le contrôle de la prolifération des cellules normales et cancéreuses. La figure 3.4 résume les actions de p38 dans plusieurs processus cellulaires.

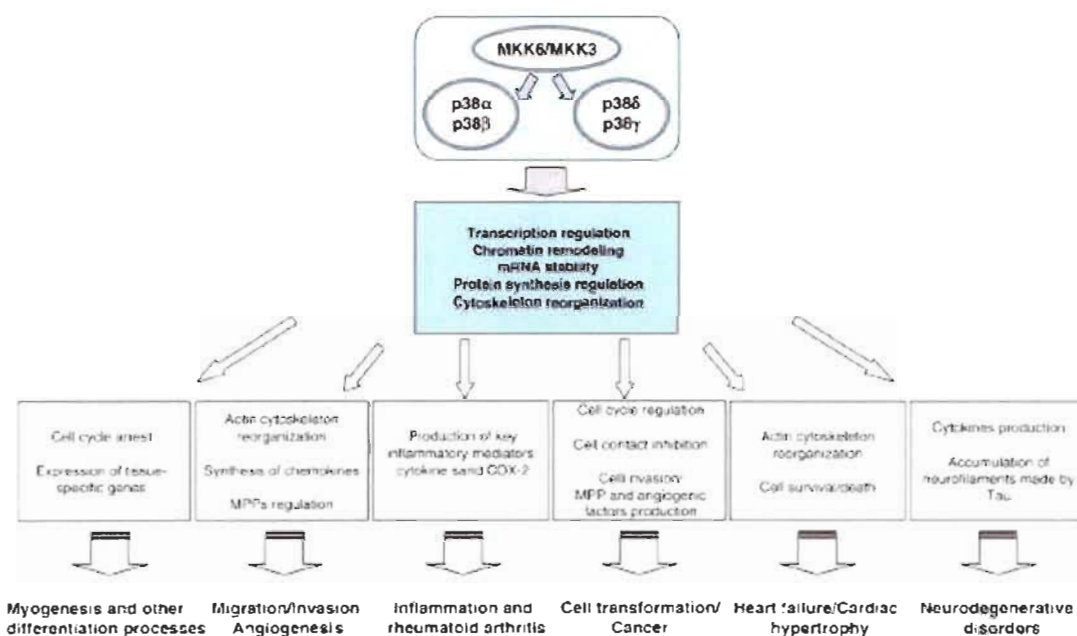


FIGURE 3.4 Conséquences de l'activation de la MAP kinase p38. L'activation de p38 est associée à plusieurs processus comme l'arrêt du cycle cellulaire, la production de facteurs pro-inflammatoires, l'inhibition de contact et l'angiogénèse, entre autres. Tiré de (176).

3.4 Les macrophages associés aux tumeurs

Généralement, la présence d'une réaction immunitaire est un événement à priori bénéfique. Ainsi, la présence de leucocytes dans l'environnement tumorale semble normale et souhaitable. Depuis plusieurs années, des études ont démontré une forte présence de macrophages au sein de la plupart des tumeurs solides (51, 193, 194). Ces études ont mis en évidence un lien de proportionnalité entre un niveau d'infiltration élevé de macrophages et un mauvais pronostic. Puisque les macrophages sont très impliqués dans le développement et la résolution de la réponse inflammatoire, Mantovani *et al.* ont émis l'hypothèse qu'il est possible qu'ils favorisent la progression tumorale.(193). En effet, le concept de *tumor-associated macrophages* (TAMs) a été proposé pour expliquer pourquoi les macrophages n'étaient plus capables d'exercer leurs fonctions tumoricides habituelles.

Bien que les macrophages puissent éliminer les cellules anormales dans un contexte physiologique normal, il est proposé que les TAMs se comporteraient davantage comme des macrophages polarisés en type M2 (52). En effet, les macrophages M2 sont une source importante de facteurs angiogéniques comme le VEGF et FGF, ils ont des fonctions cytotoxiques diminuées voir nulles, et sont également une source de cytokines immunosuppressives qui pourraient freiner une réponse immunitaire adaptée contre les tumeurs (194). L'endomètre exprimant une variété de cytokines majoritairement de type 2 selon la littérature (195), il est fort possible que les macrophages utérins puissent être polarisés en M2 et exercer un effet immunosuppresseur. Cependant, puisqu'il ne s'agit pas d'une dichotomie stricte mais plutôt d'un équilibre, il est possible de considérer les TAMs comme une population dynamique composée de M1 et de M2.

3.5 Les cellules T régulatrices et les cancers

Depuis la découverte des cellules Treg, plusieurs chercheurs ont avancé l'hypothèse que les Treg seraient impliquées dans l'immunosuppression observée dans les cancers. Cette hypothèse s'est vue renforcée avec la publication de données démontrant une présence des Treg dans plusieurs tumeurs. Onizuka et al (196) ont montré que

l'administration *in vivo* d'anticorps anti-CD25 quelques jours avant d'inoculer des cellules tumorales induisait le rejet des tumeurs dans six cas sur huit (quatre leucémies et deux sarcomes) dans des souris syngéniques. Les auteurs ont observé une diminution du nombre de cellules Treg dans les nœuds lymphatiques. Ils en ont conclu que les cellules Treg participaient à l'inhibition de l'immunité antitumorale. Des résultats semblables ont été confirmés par une autre équipe dans des souris déplétées en cellules Treg où l'immunité anti-tumorale a été réactivée avec l'apparition de cellules Tc spécifiques contre la tumeur (197). Dans une autre étude, l'analyse du sang périphérique de patients atteints du cancer du pancréas et du sein révèle une augmentation de 20.2% de la proportion de cellules Treg au niveau des nœuds lymphatiques comparé aux patients contrôles (198). Dans une autre étude, des patients souffrant de mélanome présentent aussi une augmentation de 6% de la proportion des Treg dans les nœuds lymphatiques (199). Au niveau gynécologique, quelques études ont été publiées rendant compte d'une infiltration des cellules Treg dans des tumeurs ovariennes et dans les nœuds lymphatiques drainant la région, chez la femme (200-202). Deux de ces études ont conclu que le niveau d'infiltration des Treg était directement proportionnel à un pronostic défavorable. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cancers malins et pré-malins du col utérin (203, 204). De plus, l'étude de Curiel *et al.* (200) a montré un lien clair entre l'implication de CCL22 et le recrutement des cellules Treg en montrant que l'injection *in vivo* d'un anticorps anti-CCL22 inhibait la migration médiée par CCL22 des cellules Treg vers des tumeurs ovariennes inoculées dans des souris NOD/SCID. Signalons que ces souris ne possèdent pas de système immunitaire mature en raison d'une mutation sur le chromosome 16 empêchant la réorganisation des gènes VDJ responsables de la synthèse des récepteurs T et des immunoglobulines (205). Ce sont donc d'excellents modèles *in vivo* pour greffer des cellules tumorales sans qu'il n'y ait de rejet.

CHAPITRE 4

4 Projet de recherche

4.1 Problématique et hypothèse

À la lumière des informations présentés en première partie, on réalise que l'endomètre, lorsqu'il n'y a pas de gestation, est un milieu soumis à une inflammation chronique. Il subi un influx de cellules inflammatoires qui sont une source de cytokines pro-inflammatoires capables d'influencer le cycle cellulaire et favoriser la sécrétion d'un répertoire de cytokines inflammatoires via l'activation soutenue de NF- κ B dans les cellules épithéliales et stromales. Certaines voies de signalisation semblent impliquées dans la progression tumorale, et STAT3 et p38 pourraient se révéler des cibles thérapeutiques intéressantes dans le futur. Pour qu'un cancer se développe, il est nécessaire qu'un certain nombre de facteurs soient réunis. Il leur est indispensable qu'un environnement favorable soit présent. Le concept d'immunoédition a été développé pour expliquer comment les cellules cancéreuses réussissent à échapper au système immunitaire (206). Selon ce modèle, les cancers traversent trois phases successives: l'élimination, l'équilibre et l'évasion. Ce modèle explique que dans un premier temps, le système immunitaire élimine les cellules pro-cancéreuses efficacement, c'est l'élimination. Il survient alors une étape d'équilibre. Durant cette étape, suite aux

pressions sélectives du système immunitaire, certains clones survivent aux attaques immunitaires et continuent de muter. Finalement, les clones qui ont survécu finiront par échapper aux défenses immunitaires, c'est l'évasion. En d'autres termes, le système immunitaire sculpterait l'environnement tumoral en favorisant l'apparition de clones résistants. Les macrophages, à titre de leucocytes, seraient associés à ce phénomène.

L'endomètre est un tissu où les macrophages sont présents de façon physiologique pour accomplir plusieurs tâches contribuant à l'homéostasie. Or, les macrophages utérins sont soumis à toutes sortes de signaux (voir figure 1.4, page 12) qui déterminent leur polarisation et modulent leurs fonctions (207). Il est important de se pencher sur la question considérant que le tissu endométrial est naturellement soumis à un processus inflammatoire cyclique (chronique) et soutenu durant une longue période de temps au cours de la vie d'une femme. Ce qui étonne lorsque l'on cherche dans la littérature sur les TAMs et les cancers endométriaux, c'est le peu d'information disponible. Notre problématique s'articule donc autour de ce manque de connaissance. Une compréhension des interactions fonctionnelles entre les macrophages et les cellules endométriales est indispensable pour progresser dans nos connaissances sur les cancers gynécologiques associés à l'inflammation. Selon la littérature, les macrophages M1 seraient essentiellement anti-tumoraux car capables d'induire une inflammation et s'attaquer aux cellules cancéreuses par la production de radicaux oxygénés et une phagocytose efficace (49). De l'autre côté, les macrophages associés aux tumeurs seraient pro-tumoraux en se comportant comme des M2 (51). Les arguments qui supportent cette hypothèse sont la capacité des M2 à sécréter des facteurs angiogéniques (VEGF), des facteurs de croissances (FGF, EGF) mais aussi des protéines qui dégradent la matrice extracellulaire (MMP-3, 9), pouvant favoriser la dissémination des cellules tumorales et les métastases.

Notre hypothèse de travail est que la progression des cancers endométriaux soit favorisée par la présence d'un milieu immunologiquement tolérant, où les facteurs solubles de macrophages polarisés en M1 ou M2 pourraient influencer le comportement des cellules cancéreuses pouvant favoriser l'inflammation et la survie des cellules

cancéreuses.

Quatre objectifs ont été poursuivis pour évaluer cette hypothèse :

1. Évaluer la présence d'un environnement immunosuppresseur ainsi que la présence de macrophages dans l'endomètre par l'analyse de biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux;
2. Déterminer si les facteurs solubles de macrophages polarisés, M1 ou M2, modulent la prolifération d'une lignée de cellules endométriales cancéreuses;
3. Déterminer si ces facteurs induisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires et régulatrices de la voie STAT3 dans les cellules endométriales cancéreuses;
4. Évaluer l'état d'activation des voies STAT3 et p38 suite au contact avec les facteurs solubles des macrophages M1 ou M2.

Le premier objectif de ce travail visait à évaluer par RT-PCR la présence de marqueurs cellulaires témoignant d'une immunosuppression locale dans des biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux, et d'attester de la présence de macrophages dans ces mêmes tissus. Lorsque l'on parle d'un environnement immunosuppresseur, on fait référence à certaines cytokines qui sont associées à une inhibition de l'activation de l'immunité innée mais aussi adaptée. Les cytokines IL-10 et TGF- β et des prostaglandines comme le PGE₂ sont impliqués dans la régulation de la réponse immune (208, 209) et ils sont donc des signes d'un environnement potentiellement tolérant et immunosuppresseur. Pour les macrophages, l'expression des récepteurs CD16 et CD14 témoigne de la présence de macrophages et est utilisé dans plusieurs études pour identifier ces derniers (210-212).

En plus d'un milieu immunosuppresseur, les objectifs 2, 3 et 4 visent à évaluer l'hypothèse suggérant que des facteurs solubles de macrophages polarisés contribuent à la progression des cancers endométriaux. Pour évaluer cette possibilité, différents paramètres d'activation cellulaire ont été analysés. La prolifération cellulaire est un de

ceux-ci. Ce paramètre est important car les cellules cancéreuses sont capables de proliférer de façon incontrôlée. Il serait donc possible que les facteurs solubles de macrophages M1 et M2 y contribuent car bien que les macrophages M1 soient décrits comme des cellules capables de détruire les cellules infectées et les microorganismes, les M2 sont des producteurs de facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques qui pourraient, eux, favoriser la prolifération cellulaire (49, 193).

Outre les effets sur la prolifération cellulaire, il est probable que les facteurs solubles activent la transcription de gènes pro-inflammatoires dans les cellules cancéreuses. Des cytokines comme le IL-6, le TNF- α , le MCP-1 et le LIF sont étroitement reliées à la carcinogenèse (213, 214) et pourraient être exprimées par les cellules du cancer endométrial suite au contact avec les facteurs solubles. Si les milieux conditionnés (MCs) contiennent des facteurs solubles agissant sur le comportement des cellules tumorales, il est probable que l'activation de voies de signalisation en témoigne. Plusieurs cytokines/chémokines pro-inflammatoires signalent via la voie JAK/STAT mais sont également sous son contrôle transcriptionnel. Étant donné que l'on a rapporté dans nombre d'études (215-219) une activation soutenue de STAT3 dans plusieurs cancers, il est possible que les facteurs solubles des macrophages participent à cette activation. La régulation normale de la voie STAT résulte de l'action de protéines inhibitrice, les SOCS. Une perte d'expression de ces régulateurs naturels serait peut-être responsable de l'activation soutenue de STAT3 rapporté par diverses études. L'expression des SOCS n'est pas encore connue au niveau des cancers endométriaux. Il est donc important d'évaluer si les facteurs solubles de macrophages modulent ou non STAT3 et si la régulation de cette voie par SOCS-1 et SOCS-3 est fonctionnelle. La voie des MAPK p38 est impliquée, entre autre, dans le contrôle du cycle cellulaire et une activation aberrante pourrait être impliquée dans la transformation des cellules normales vers un phénotype cancéreux (176, 187, 190, 220).

4.2 Méthodologie

4.2.1 Biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux

Les biopsies provenaient d'une banque de tissus établie par le Dr. Éric Asselin en collaboration avec le Centre Hospitalier Régional de Trois-Rivières (CHRT) et de clinique gynécologiques de Trois-Rivières, Canada. Les échantillons de tissus étaient préalablement catégorisés par le pathologiste en tant qu'épithélium prolifératif normal, sécrétoire normal ou cancéreux. Pour les épithéliums prolifératifs, aucune information sur le jour du cycle n'était disponible. Pour les tissus sécrétoires, le jour du cycle était noté et les tissus ont été regroupés du jour 16-23 comme étant sécrétoire. Pour les tissus normaux, 7 échantillons ont été utilisés pour établir une valeur moyenne. Pour les tissus cancéreux, seulement 4 échantillons cancéreux d'adénocarcinome étaient disponibles pour les analyses. Pour les carcinomes, les grades étaient inconnus. L'ARN totale isolée de plusieurs échantillons étaient déjà disponible et l'ARN totale de quelques échantillons ont été isolés avec la méthode du Trizol pour une extraction au chloroforme/isopropanol.

4.2.2 Monocytes du sang périphérique

Pour réaliser ces objectifs, il fallait préalablement obtenir un modèle de macrophages polarisés en M1 et M2. Selon la littérature, il est possible d'obtenir de tels macrophages *in vitro* en stimulant des monocytes de façon appropriée (49, 221). Les monocytes peuvent être isolés du sang périphérique et être différenciés pour obtenir des macrophages. La méthode privilégiée ici pour la purification est la séparation par gradient de Ficoll (Wisent, Ville Saint-Laurent, Canada). Il s'agit d'une méthode très simple, peu coûteuse et rapide qui permet un bon rendement, de l'ordre de 80 à 120 millions de monocytes par 450 ml de sang. De plus, la pureté est de 90% avec des niveaux pouvant atteindre 95% (222). Cette méthode de purification tire profit de deux caractéristiques fondamentales : 1) la densité des leucocytes : plus faible par rapport aux érythrocytes; plus élevée par rapport aux plaquettes 2) la capacité d'adhésion des monocytes en plaque pour les séparer du reste des leucocytes.

Une fois les monocytes purifiés, ils sont stimulés avec un facteur de différenciation, le M-CSF. Ce dernier est le principal facteur qui permet à la lignée monocyttaire de se différencier en macrophage. C'est le facteur le plus couramment utilisé dans la littérature. Cependant, un autre facteur, le GM-CSF, qui lui est très apparenté, peut également produire des macrophages. Le GM-CSF étant très présent dans l'endomètre (103), il était pertinent de l'utiliser au même titre que le M-CSF. Les monocytes ont donc été différenciés avec ce facteur, créant ainsi deux populations de macrophages qui ont ensuite été polarisés selon le même protocole. Les macrophages polarisés sont dénommés MM1 et MM2 ou GM1 et GM2 pour le M-CSF et le GM-CSF, respectivement. La figure 4.1 résume les étapes de différenciation.

JOUR	1	2	3	4	5
MM0	M-CSF	M-CSF	M-CSF	M-CSF	M-CSF
GM0	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF
MM1	M-CSF	M-CSF	M-CSF	M-CSF	M-CSF
GM1	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF
				INF- γ LPS	
MM2	M-CSF	M-CSF	M-CSF	M-CSF	M-CSF
GM2	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF	GM-CSF
				IL-4 IL-10	

FIGURE 4.1 Différenciation et polarisation des macrophages. Après la purification du sang, les monocytes sont premièrement soumis à une différenciation en macrophages par stimulation au M-CSF ou au GM-CSF pendant 3 jours. Par la suite, le milieu de culture est changé pour du milieu frais auquel le LPS (100 ng/ml) et l'INF- γ (25 U/ml) sont ajoutés pour produire des M1 et de l'IL-4 et l'IL-10 (20 ng/ml les deux) pour produire des M2. Les facteurs solubles produits par les macrophages s'étant accumulés pendant 48 heures, les MC ont été récupérés et conservés à -80 °C.

Les monocytes étaient soumis à une dose de 10 ng/ml de M-CSF ou de GM-CSF pendant 72 heures dans du milieu RPMI 1640 sans sérum pour éviter les interférences avec les facteurs de croissance présents dans le sérum. Suite à la période de maturation, le milieu a été changé pour du milieu frais auquel on a ajouté à nouveau du M-CSF et/ou GM-CSF à 10 ng/ml et selon le type de macrophages : pour les M1, INF- γ à 25 U/ml et du LPS à 100 ng/ml, et pour les M2, IL-4 et IL-10 à 20 ng/ml pendant 48h. Après ce délais, les MCs sont récupérés et congelés à - 80 °C pour conservation. La quantité de monocytes utilisés était d'environ 3 à 4 millions par type de macrophages dépendamment de la quantité de monocytes isolés. Les différentes cytokines utilisées ont été achetées chez Peprotech (New Jersey, USA).

4.2.3 Lignées cellulaires utilisées

Pour réaliser ces expériences, la lignée cellulaire Hec-1A a été utilisée. Il s'agit d'un adénocarcinome endométriale humain isolé en 1968 d'une femme de 72 ans. La lignée est disponible chez *l'American Type Culture Collection* (ATCC), # HTB-112. Les cellules étaient maintenues dans du RPMI 1640 (Wisent, Ville Saint-Laurent) malgré la recommandation d'utiliser le McCoy. La raison étant que les MCs de macrophages sont produits avec du RPMI 1640, cela évitait de devoir faire subir aux Hec-1A des variations de milieux de culture fréquemment.

4.2.4 Essai de prolifération

La prolifération des cellules a été évaluée à l'aide du test MTT. Ce test repose sur la transformation d'un composé, le 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) soluble dans l'eau, en un composé violet et insoluble, le formazan. (223). La réaction dépend d'une enzyme mitochondriale, la succinate-déhydrogénase. La coloration finale est obtenue en solubilisant les cristaux avec une solution de SDS 10% et HCl 10 mM. La densité optique, lue à 580 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Le MTT provient de chez Sigma-Aldrich, Oakville, Canada.

Les cellules Hec-1A étaient mises en plaque de 96 puits à une densité de 5000 cellules/puits et incubées pour 24 heures en incubateur (37°C, 5% CO₂). Par la suite, les milieux de culture ont été changés pour 100 µl de MCs. Les milieux contrôles MM0 et GM0 ont été utilisés pour évaluer la différence entre les macrophages activés et non activés. Après 48 heures, 10 µL d'une solution MTT (5 mg/ml) ont été ajoutés. Après 3.5 heures d'incubation, 100 µL de solution de solubilisation ont été ajoutés (10% SDS, 10 mM HCl) et la plaque de 96-puits placée pour la nuit dans un incubateur. La lecture a été effectuée avec un lecteur FLUOStar Optima, BMG LABTECH, Allemagne.

4.2.5 Isolation d'ARNm et RT-PCR

Pour évaluer l'expression des gènes, la méthode du RT-PCR a été utilisée. Les cellules ont été mises en plaque de 6 puits à une densité de 1 million de cellules/puits et incubées pour 24 heures avant stimulation. Par la suite, le milieu de culture de chaque puits a été remplacé par le MC correspondant pour une durée de 6 et 24 heures. Le milieu était aspiré et les cellules récupérées dans le réactif Trizol (Invitrogen, Burlington, Canada) pour en extraire l'ARNm. Une extraction au chloroforme suivie d'une précipitation à l'isopropanol 50% permettait de récupérer le culot d'ARN. Ce dernier a été lavé 3 fois avec de l'éthanol 75% et finalement suspendu dans 30 µL d'eau DEPC sans RNase. L'ARN a ensuite été dosé à l'aide d'un spectrophotomètre GeneQuant (Biochrom, Cambridge, Royaume-Uni). L'ARNm a été rétrotranscrit (0,4 µg) en ADNc par la reverse transcriptase (RT). Les échantillons ont été incubés 10 minutes à 65 °C avec 2 µL d'une solution 20 µM d'oligodT.

Par la suite, à chaque échantillon a été ajouté 10 µL d'une solution contenant : le tampon de réaction 1X (avec DTT), les dNTPs à une concentration de 5 mM et l'enzyme Mu-MLV (10 U/µL) pour un total de 20 µL. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 1 heure. Après rétrotranscription, 5 µL d'ADNc a été ajouté à 45 µL d'un mélange contenant : H₂O DEPC, dNTP 5 mM, amorces sens et anti-sens à 12 µM, tampon PCR 1X et l'enzyme Taq Pol à 30 mU. La liste des amorces est disponible dans le tableau 4.1 (page 49). Les échantillons ont été soumis au programme suivant : 94°C 5

minutes; 94°C 30 sec; °C variables 30 sec; 72°C 30 sec et le cycle était répété (variable). Le gène domestique GAPDH a été utilisé comme contrôle interne pour normaliser les valeurs de densité optique sur une base comparable. Les produits ont été obtenus de New England Biolabs (Ontario, Canada). Les amorces ont été synthétisées par Invitrogen, (Burlington, Canada). Les amorces ont été produites à l'aide des séquences cDNA disponibles sur Medline et du site web d'Invitrogen.

4.2.6 Analyse par Western Blot

Une des méthodes pour évaluer l'activation des voies de signalisation est d'analyser l'état de phosphorylation des protéines en question immédiatement après stimulation. La phosphorylation étant un phénomène rapidement inhibé, des temps de stimulation de 5 à 30 minutes sont généralement utilisés. Pour ce faire, la méthode du Western Blot a été utilisée. Les cellules Hec-1A ont été mises en plaque de 24 puits à une densité de 150 000 cellules/puits et incubées pendant 24h. Avant la stimulation, le milieu avait préalablement été changé pour du milieu frais sans sérum pendant 4h. Ensuite, les milieux ont été remplacés par les différents MCs et les cellules ont été incubées pendant 5, 15 et 30 minutes. Après le temps écoulé, le milieu a été aspiré. Un volume de 200 μ L/puits d'un tampon Tris-SDS (125 mM Tris pH 6.8, SDS 2%, avec β -mercaptoéthanol 700 mM) contenant de l'orthovanadate de sodium (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) à 2 mM et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche, Montréal, Canada) chauffé à 100°C a été ajouté pour arrêter la stimulation et recueillir les protéines. L'orthovanadate de sodium est un inhibiteur compétitif des tyrosines phosphatases. Chaque échantillon a été préparé pour l'électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions réductrices avec un gel de compression de 4% bis-acrylamide et un gel de séparation de 10%. La totalité du lysat cellulaire a été déposée sur gel. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (Millipore, Bedford, USA) et la membrane bloquée avec une solution 5% lait écrémé et 0,1% Tween-20 dissous dans du tampon PBS 1X (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM K₂HPO₄).

TABLEAU 4.1
Amorces utilisées pour les analyses RT-PCR

Amorces	Séquence	Taille (pb)	T °C
GAPDH sens	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	212	58
GAPDH asens	5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3'		
IL-6 sens	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3'	610	62
IL-6 asens	5'-TGGACTGCAGGAACCTCCTT-3'		
MCP-1 sens	5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATA-3'	203	61
MCP-1 asens	5'-CAGATCTCCTTGGCCACAAT-3'		
CCL22 sens	5'-ACTGCACTCCTGGTTGTCCTCG-3'	172	63
CCL22 asens	5'-CCTCGGGCAGGAGTCTGAGGTCAG-3'		
TGF- β sens	5'-GGCAGTGGTTGAGCCGTGGA-3'	531	60,5
TGF- β asens	5'-TGTTGGACAGCTGCTCCACCT-3'		
TNF- α sens	5'-CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG-3'	325	57,5
TNF- α asens	5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'		
IL-10 sens	5'-TGAGAACCAAGACCCAGACA-3'	182	62
IL-10 asens	5'-TCATGGCTTTGTAGATGCCT-3'		
SOCS-1 sens	5'-CGACTACCTGAGCTCCTTC-3'	406	59,8
SOCS-1 asens	5'-AAAATAGGATTCTGCACAGC-3'		
SOCS-3 sens	5'-ACCTTCAGCTCCAAGAGCGAGTA-3'	443	53
SOCS-3 asens	5'-CGGAGTAGATGTAATATGGCTCT-3'		
LIF sens	5'-GAGCTCAATGGCAGTGCCAA-3'	470	58
LIF asens	5'-GTTACAGCACACTTCAAGAC-3'		
FoxP3 sens	5'-GAGAAGCTGAGTGCCATGCA-3'	88	61
FoxP3 asens	5'-AGGAGCCCTTGTCGGATGAT-3'		

Les anticorps primaires utilisés ont été générés chez la chèvre. Ils ont été incubés pendant au moins une heure à température pièce avec les différents anticorps : l'anti-STAT3 phosphorylé (1:8000); l'anti-STAT3 total (1:10000); l'anti-p38 phosphorylé (1:5000) et l'anti-p38 total à (1:10000). L'anticorps secondaire était un anti-chèvre IgG de souris conjugué à la peroxydase de raifort. Les anticorps primaires ont été dilués dans une solution de PBS avec albumine bovine à 5%. L'anticorps secondaire a été dilué dans une solution 5% lait écrémé et 0,1% Tween-20 dissous dans du PBS. La solution de détection au luminol provenait de chez Pierce (Rockford, USA). L'expression des protéines STAT3 et p38 totale a été utilisée comme contrôle. Tous les anticorps primaires ont été obtenus chez Cell signalling, New England Biolabs, Ontario. L'anticorps secondaire a été acheté chez Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA).

4.2.7 Analyses informatiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism, version 3.03 en utilisant le test anova unidirectionnel et le Turkey's post test avec un $p < 0,05$ considéré comme significatif. La densitométrie des gènes a été effectuée avec le logiciel Quantity One de Bio-Rad, version 4.5.1.

4.3 Résultats

4.3.1 Les biopsies de tissus endométriaux normaux et cancéreux contiennent des marqueurs cellulaires des macrophages mais aussi des cytokines immunosuppressives telles que TGF- β et IL-10.

Plusieurs études rapportent la présence de macrophages infiltrant les tumeurs dans différents types de cancers (193, 213). Dans le but d'évaluer la présence de macrophages dans les biopsies de tissus endométriaux, l'expression des récepteurs CD16 et CD14, récepteurs aux anticorps et au LPS, respectivement, a été analysée (figure 4.2). Pour les tissus normaux, l'épithélium prolifératif exprime davantage les deux récepteurs que l'épithélium sécrétoire. Les tissus cancéreux, expriment les deux récepteurs bien que de façon moindre par rapport aux tissus prolifératifs. Les résultats de densitométrie représentent 4 échantillons de tissus prolifératifs, 5 de tissus sécrétoires et 4 de tissus cancéreux.

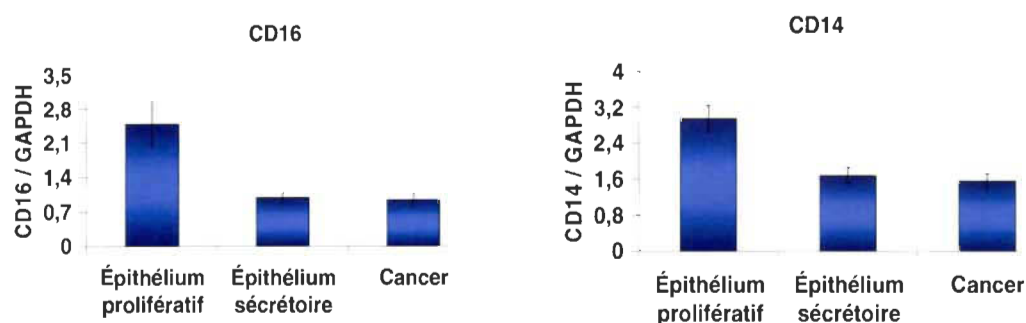


FIGURE 4.2 Expression des marqueurs des macrophages dans les biopsies de tissus endométriaux. Les tissus provenaient d'une banque en collaboration avec le Dr. Éric Asselin (UQTR). L'analyse par RT-PCR révèle la présence de CD16 et CD14 dans les tissus normaux et cancéreux. Dans le cas des tissus normaux, l'épithélium prolifératif est celui où l'expression est la plus élevée. Les échantillons cancéreux expriment également les deux récepteurs, témoignant de la présence de macrophages.

Pour qu'une tumeur puisse se développer, il est nécessaire que les mécanismes de défense immunitaire anti-tumoraux soient inhibés. L'existence d'un environnement immunosuppresseur est donc un avantage pour toutes tumeurs en développement (224, 225). Dans le but d'évaluer cette possibilité, les biopsies de tissus ont été analysées à la recherche de différentes molécules immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β (figure 4.3). Les tissus normaux et cancéreux expriment tous deux les cytokines IL-10 et TGF- β dans des proportions variables. L'épithélium prolifératif exprime davantage IL-10 que l'épithélium sécrétoire. Pour le TGF- β , c'est l'épithélium sécrétoire qui en

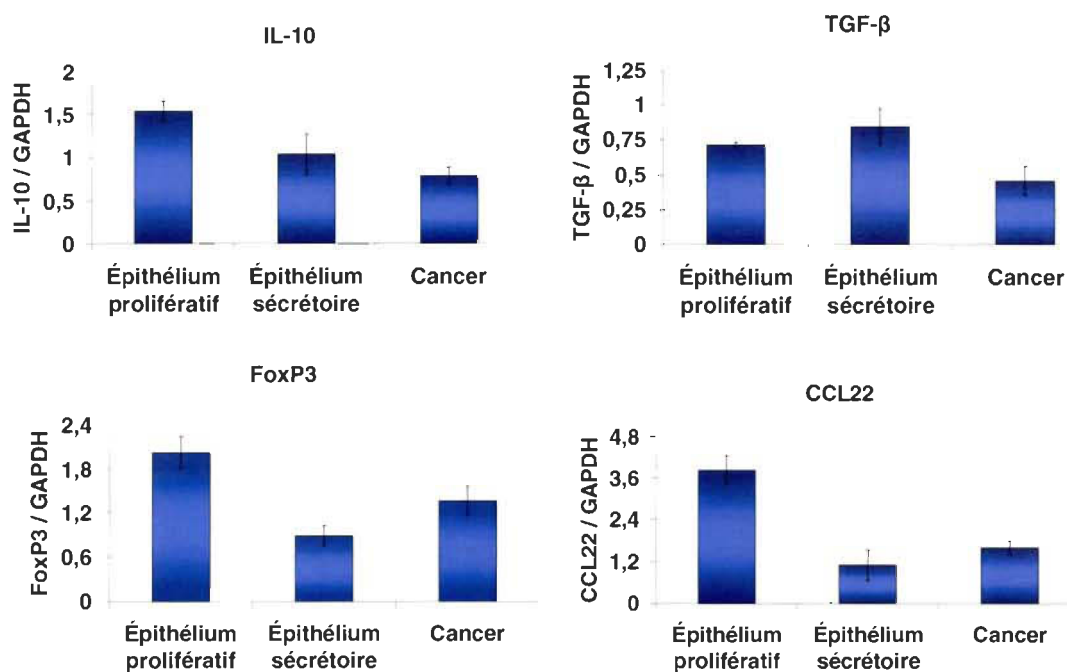


FIGURE 4.3 Expression des cytokines immunosuppressives et marqueurs des cellules Treg dans les biopsies de tissus endométriaux. L'analyse par RT-PCR révèle la présence de deux cytokines considérées comme immunosuppressives. L'IL-10 et le TGF- β sont exprimés dans tous les tissus, normaux et cancéreux. Dans le cas des tissus normaux, l'épithélium prolifératif est celui où l'expression est la plus élevée pour l'IL-10, mais pas pour le TGF- β qui lui est plus exprimé dans l'épithélium sécrétoire. Les résultats démontrent également la présence d'un facteur de transcription associé à la présence de cellules Treg, Foxp3. L'expression est plus élevée dans les tissus prolifératifs que sécrétoires. Les tissus cancéreux expriment également FoxP3 à un niveau intermédiaire. CCL22 est une chémokine qui agit sur le trafic des cellules Treg dans les tissus. Les tissus prolifératifs en expriment une plus grande quantité que les tissus sécrétoires. Les tissus cancéreux expriment également cette chémokine à des niveaux plus grands ou similaires aux épithéliums prolifératifs et sécrétoires.

exprime la plus grande quantité. Comme pour l'expression de CD14 et CD16, les tissus cancéreux expriment aussi les deux cytokines à des niveaux notables.

L'analyse des tissus a également révélé la présence d'un facteur de transcription particulier, FoxP3. Ce dernier est associé au phénotype particulier des lymphocytes T régulateurs (226, 227) et en ce sens, donne un indice sur la présence de ces cellules dans les tissus analysés. Une dernière molécule d'intérêt a également été détectée dans les tissus, la chémokine CCL22, aussi connu sous le nom *macrophage derived chemokine*. Cette dernière est une molécule reconnue pour attirer les cellules T régulatrices dans les tissus et donc participe probablement à créer un environnement immunosuppresseur favorable au développement des tumeurs (30). Tous les tissus analysés en expriment. L'épithélium sécrétoire en exprime une plus faible proportion que l'épithélium prolifératif. Les tissus cancéreux sont positifs pour l'expression de CCL22 à un niveau plus faible que les tissus prolifératifs.

4.3.2 La prolifération des cellules cancéreuses est diminuée par les milieux conditionnés GM1, GM2, MM1 mais augmentée par celui de MM2.

Les cellules Hec-1A ont été traitées avec les MCs de macrophages pendant 48h. Les résultats (figure 4.4, page 54) obtenus montrent que les milieux de GM1, GM2 et MM1 ont eu un effet inhibiteur d'environ 60% sur la prolifération des cellules Hec-1A. Pour le milieu MM2 on observe un effet positif sur la prolifération. En effet, le milieu MM2 a fait proliférer les cellules à un niveau significativement supérieur au contrôle avec environ 15% d'augmentation. Ces données sont en accord avec notre hypothèse de départ selon laquelle les macrophages de type M2 seraient davantage pro-tumoraux que les M1. Ces résultats mettent en évidence la présence de facteurs solubles actifs sécrétés par les différents types de macrophages.

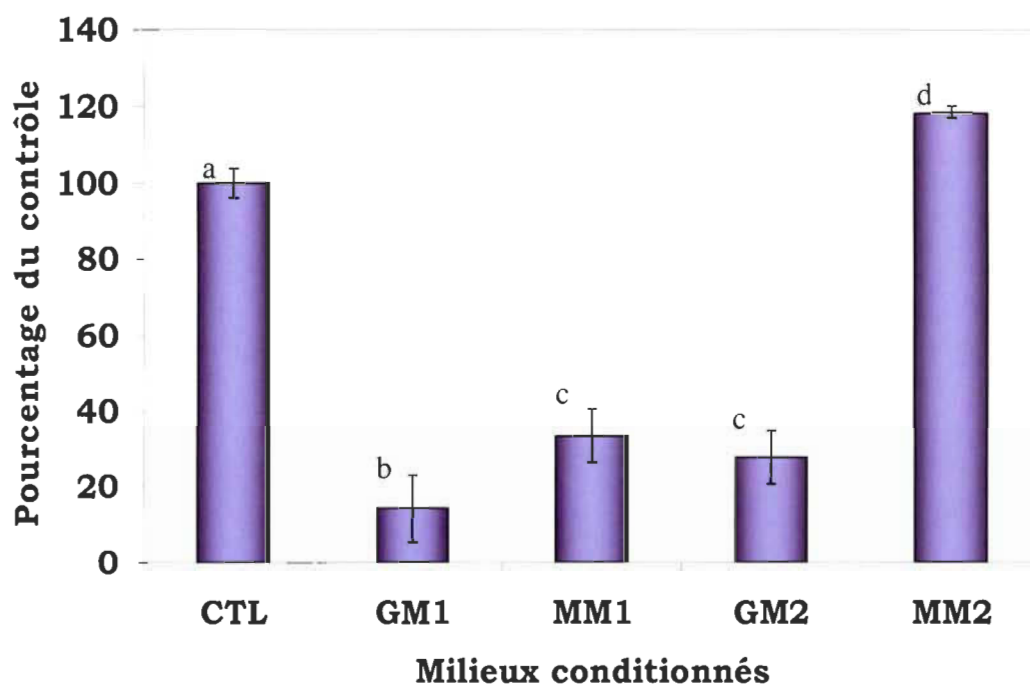


FIGURE 4.4 Les milieux conditionnés de macrophages GM1, GM2 et MM1 diminuent de façon notable la prolifération des cellules Hec-1A. Les macrophages ont été différenciés en GM1, GM2, MM1, et MM2 selon le protocole établi et les MCs recueillis. Ensuite, les cellules Hec-1A ont été mises en plaque à 5000 cellules/puit et incubées pour 24h. Le milieu de culture a été changé pour le MC correspondant et on stimulait pour 48h. Après ajout du réactif MTT, la plaque était lue par spectrophotomètre. Les milieux GM1, GM2 et MM1 se sont montrés efficaces pour diminuer la prolifération des cellules Hec-1A. Le milieu MM2 quant à lui augmente légèrement la prolifération par rapport au niveau contrôle. Les lettres différentes indiquent une différence significative avec un $p < 0,05$ selon Prism. Les résultats sont la compilation de 3 expériences différentes chacune contenant trois réplicas.

4.3.3 Les milieux conditionnés de macrophages modulent l'expression d'une variété de cytokines pro-inflammatoires, des chémokines et des protéines régulatrices de la voie STAT3.

Puisque les tests par MTT ont révélé la présence de facteurs solubles capables d'agir sur la prolifération des Hec-1A, l'effet des MCs sur l'induction de différents facteurs/cytokines d'intérêts chez les cellules Hec-1A a été étudié. Pour ce faire, les cellules ont été incubées avec les différents milieux conditionnés, tel que décrit dans la

méthodologie en page 47. Les résultats de l'expression semi-quantitative des gènes sont présentés ici, en densité optique normalisée sur l'expression de la GAPDH après analyse informatique. Toutes ces expériences ont été effectuées trois fois avec des résultats concordants selon la densitométrie.

MCP-1

MCP-1 est une cytokine reconnue pour être un puissant attracteur des monocytes au sein des tissus. De plus, certaines études ont établi que les chémokines comme MCP-1 pourraient influencer la migration des cellules cancéreuses (214). Les résultats de la figure 4.5 montrent que les MCs de GM1, GM2 et MM1 induisent MCP-1 à l'exception du milieu MM2. Des niveaux de 20, 26 et 35 fois supérieurs au contrôle ont été observés,

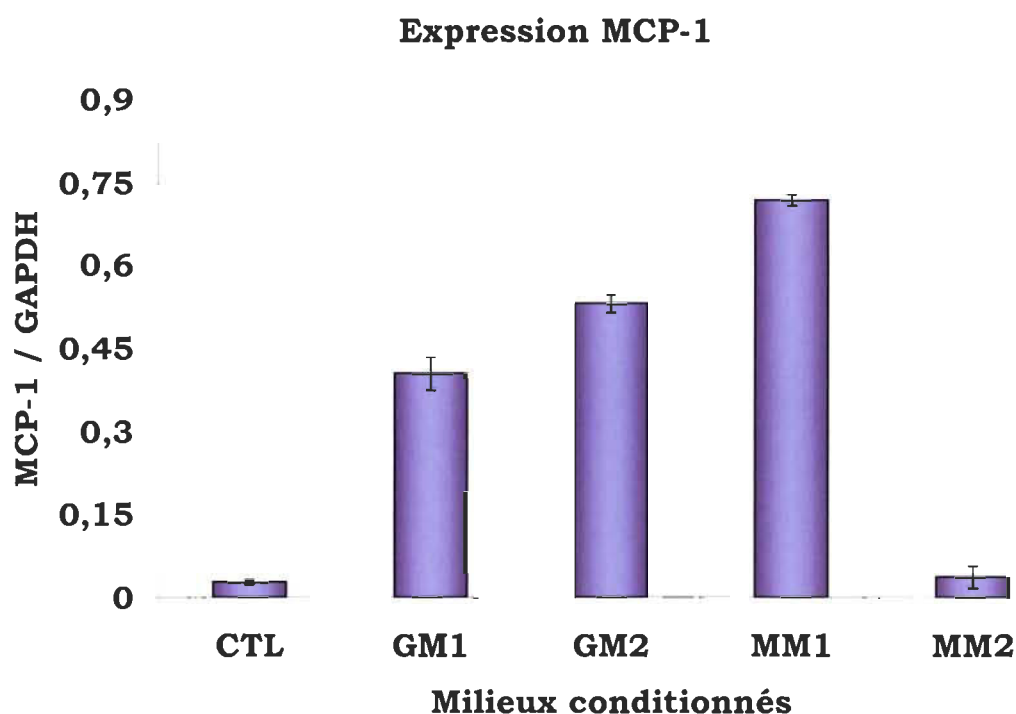


FIGURE 4.5 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent l'expression de MCP-1 après 6h de stimulation. Les cellules ont été incubées avec les milieux conditionnés correspondants et l'ARN a été recueilli et analysé par RT-PCR tel que décrit précédemment. Ces résultats montrent que les deux M.C GM1 et GM2 induisent MCP-1. En revanche, seul le milieu MM1 a pu induire MCP-1. Les données sont présentées en densité optique normalisée sur le gène contrôle GAPDH.

respectivement, chez les GM1, GM2 et MM1. Les niveaux d'expression après 24h sont revenus égaux au contrôle excepté pour le milieu GM2 où les cellules Hec-1A ont conservé une expression de MCP-1 6 fois supérieure au contrôle (résultats non montrés).

CCL22

Cette chémokine a été découverte lors d'études sur les macrophages, d'où son premier nom de *macrophage derived chemokine* (228). Depuis, il a été rapporté qu'elle possède un effet chimioattractif sur les cellules T dont les T régulatrices (229). Les résultats de stimulation montrent que les MCs GM1, GM2 et MM1 stimulent l'expression de l'ARNm du gène dans des proportions environ 26 fois supérieures au contrôle pour GM1 et GM2 et environ 16 fois supérieur pour MM1 (figure 4.6). Cependant, le milieu MM2 n'a pas réussi à induire l'expression du gène. Les résultats après 24h de

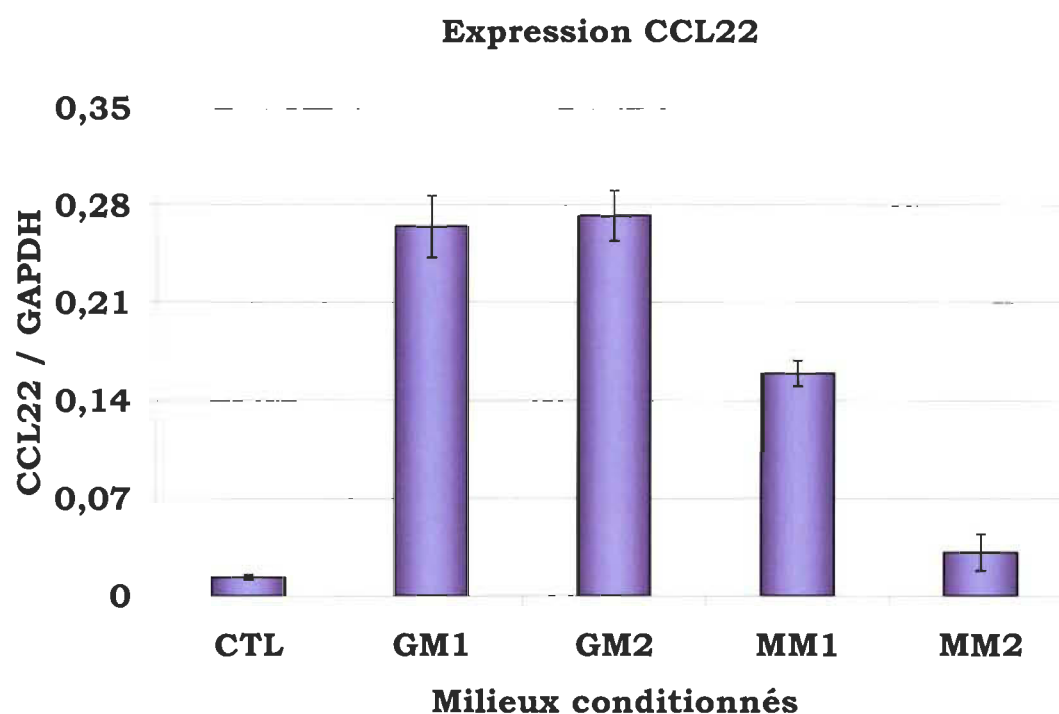


FIGURE 4.6 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent l'expression de CCL22 après 6h de stimulation. Les cellules ont été incubées avec les milieux conditionnés correspondants et l'ARN était recueillie. Les données indiquent que les MCs de GM1, GM2 et MM1 ont été les capable d'induire CCL22 avec des niveaux de 26 fois supérieurs au contrôle pour GM1 et GM2 et 15 fois supérieur pour MM1. Le milieu MM2 n'a pas induit CCL22 de façon significative.

stimulation sont demeurés exactement les mêmes pour tous les milieux excepté pour MM1 dont l'expression a augmenté à 20 fois le niveau contrôle (résultats non montrés).

TNF- α

Par la suite, l'intérêt s'est porté sur une cytokine pro-inflammatoire bien connue, le TNF- α . Des études ont révélé que du TNF- α administrées localement dans les tumeurs peut causer une régression importante de ces dernières, d'où l'appellation de facteur de nécrose tumorale (230). Cependant, d'autres études ont montré depuis, que le TNF- α peut aussi avoir des effets pro-tumoraux (231, 232). Les résultats rapportés (figure 4.7) montrent que le patron d'expression du TNF- α est similaire à celui de MCP-1. Cependant, les niveaux d'induction sont supérieurs avec des valeurs de 80, 85 et 94 fois supérieur au contrôle pour les milieux GM1, GM2 et MM1. Le milieu MM2 n'a pas

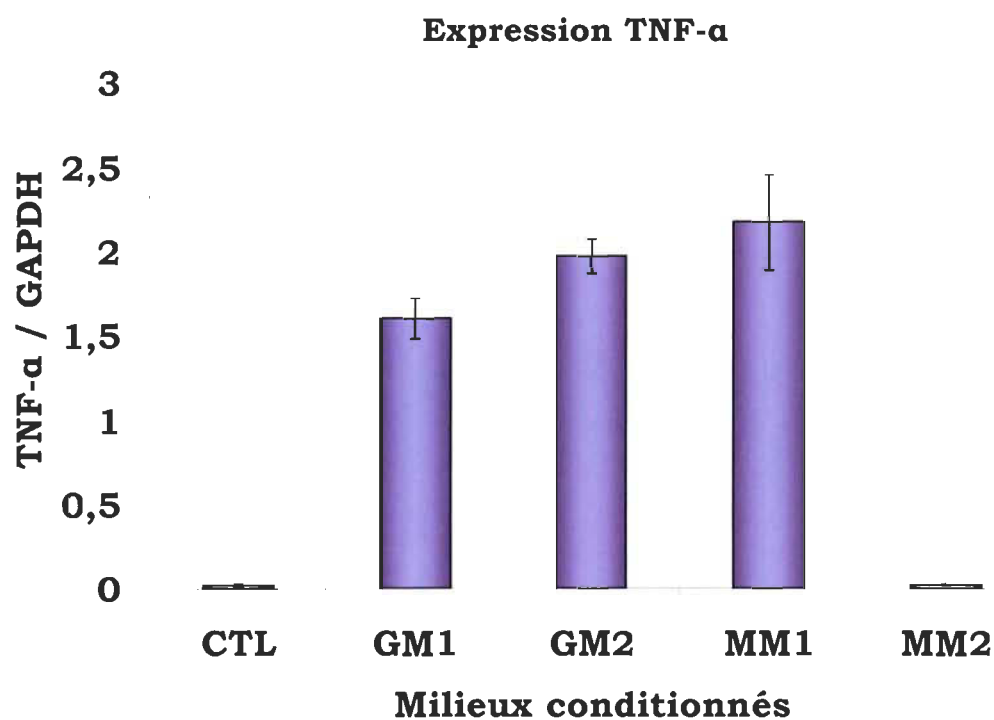


FIGURE 4.7 Les milieux conditionnés de GM1, GM2 et MM1 induisent l'expression de TNF- α après 6h de stimulation. Les cellules ont été incubées avec les milieux conditionnés correspondants et l'ARN a été recueilli. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus pour l'analyse de MCP-1. Les facteurs solubles des MCs GM1, GM2 et MM1 ont induit le TNF- α avec des niveaux atteignant environ 72, 90 et 98 fois supérieurs au niveau contrôle respectivement.

induit l'expression génique de TNF- α . Les niveaux ont diminué après 24 heures bien que les niveaux d'expression établis par GM2 et MM1 soient demeurés plus élevés que le contrôle avec induction de 60 et 21 fois respectivement (résultats non montrés).

LIF

Le LIF est une cytokine découverte il y a plus de 20 ans, mais qui est encore peu étudiée. Elle fait partie de la famille du récepteur du TNF car le récepteur au LIF possède une sous unité gp130 retrouvée dans tous les récepteurs associés au TNF. Elle possède des fonctions pléiotropiques. Il a été démontré que le LIF était critique au moment de l'implantation embryonnaire chez les souris femelles, mais aussi chez les mâles pour la production des spermatozoïdes (113). La figure 4.8 montre l'expression du LIF par les cellules endométriales en réponse aux MCs après 6h de stimulation. Les

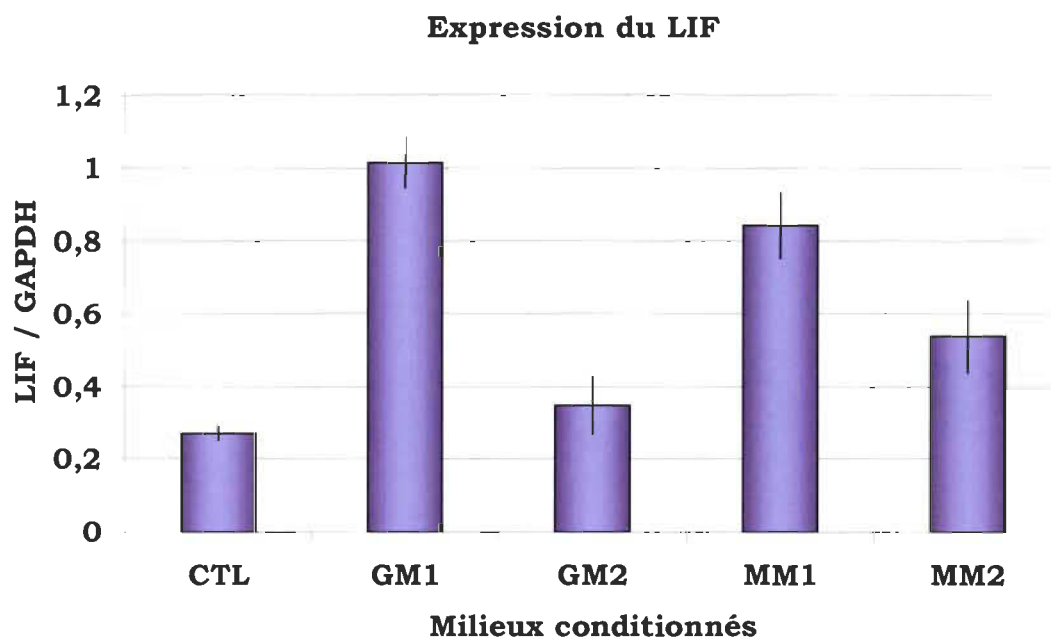


FIGURE 4.8 Les milieux conditionnés de GM1, MM1 et MM2 induisent l'expression de LIF après 6h de stimulation. Les cellules ont été incubées avec les milieux conditionnés correspondants et l'ARN a été recueilli tel que décrit précédemment. Les résultats indiquent que les facteurs solubles de MC induisent tous l'expression du LIF après 6h. Le milieu GM1 étant le plus puissant avec une induction de 3 fois supérieur au contrôle. Les milieux MM1 et MM2 stimulent l'expression du LIF environ 2,7 fois et 2 fois plus que le contrôle respectivement. Le milieu GM2 quant à lui ne réussit pas à induire le LIF de façon notable.

résultats indiquent que les MCs GM1 et MM1 induisent l'expression du gène à des niveaux de 3,5 et 3 fois supérieurs au milieu contrôle. Le milieu MM2 a également induit le gène dans une proportion 2 fois supérieure. Après 24 heures seul le niveau d'expression établi par le MC MM1 est demeuré au même niveau alors que celui établi par le milieu GM1 a chuté au niveau du contrôle (résultats non montrés).

IL-6

Tel qu'illustré à la figure 4.9, l'IL-6, une cytokine reconnue pour son activité pro-inflammatoire (233), est augmentée lorsque les cellules Hec-1A sont stimulées par le milieu GM1 avec une induction de près de 20 fois supérieure au contrôle. Le milieu MM1 a également induit IL-6 mais de façon négligeable. Pour les milieux GM2 et MM2, l'expression ne dépasse guère le niveau contrôle. Après 24 heures de stimulation, aucun niveau d'expression ne s'est maintenu et ils sont tous retournés au niveau du contrôle (résultats non montrés).

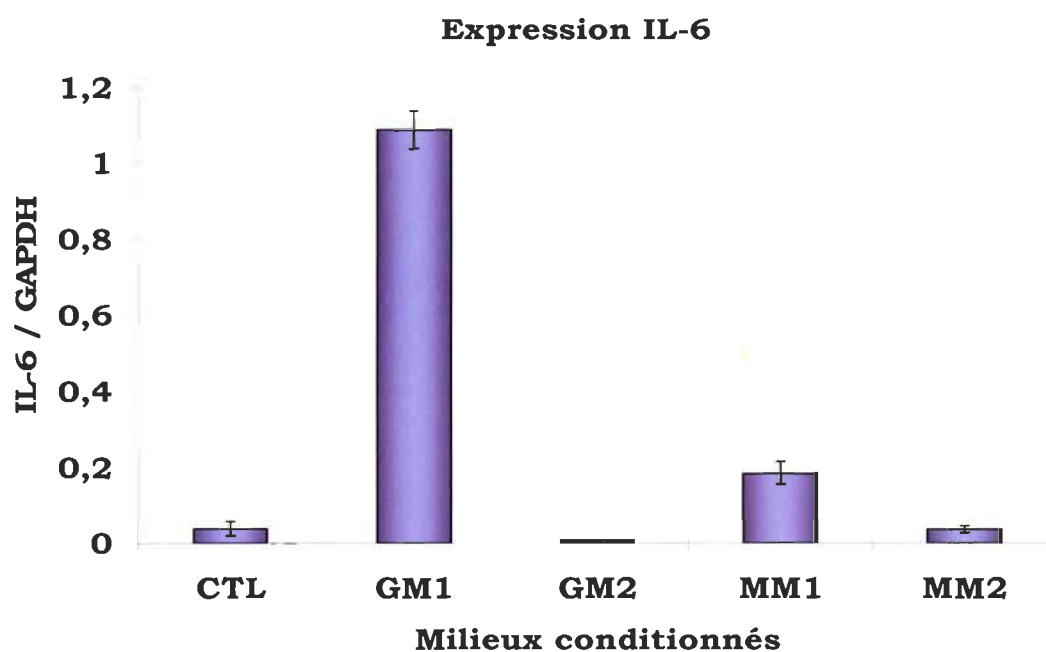


FIGURE 4.9 Les milieux conditionnés MM1 et GM1 augmentent l'expression d'IL-6 par les cellules Hec-1A. Les cellules ont été incubées pendant 6h avec les milieux conditionnés correspondants et un milieu contrôle. L'ARN a été recueilli et analysé par RT-PCR. Les résultats montrent que le MC GM1 est le seul capable d'induire de façon notable l'IL-6 avec un niveau 20 fois supérieur au contrôle.

4.3.4 Les milieux conditionnés de macrophages activent différemment les voies JAK/STAT/SOCS et p38 dans la lignée Hec-1A

La voie STAT3

Les STATs sont des facteurs de transcription qui transmettent principalement les signaux véhiculés par les cytokines, les chémokines et les facteurs de croissance. Un de ces facteurs, STAT3, a été associé à un niveau d'activation anormalement élevé dans plusieurs cellules cancéreuses (218, 219). Dans le but d'évaluer la possibilité que les facteurs solubles de macrophages puissent activer STAT3, l'analyse du niveau de phosphorylation a été effectuée dans la lignée Hec-1A stimulée avec les différents MCs. Les résultats obtenus montrent que les facteurs solubles de GM1 et MM1 ont induit STAT3 mais à des temps différents (figure 4.10). Le MC de GM1 active STAT3 aussitôt que 5 minutes après stimulation et cette dernière s'accroît et se poursuit jusqu'à 15 minutes pour disparaître à 30 minutes. Le MC de MM1 quant à lui n'a pu activer STAT3 dans les 5 premières minutes, mais on observe que l'activation est retardée à 15 minutes mais ne se prolonge pas à 30 minutes.

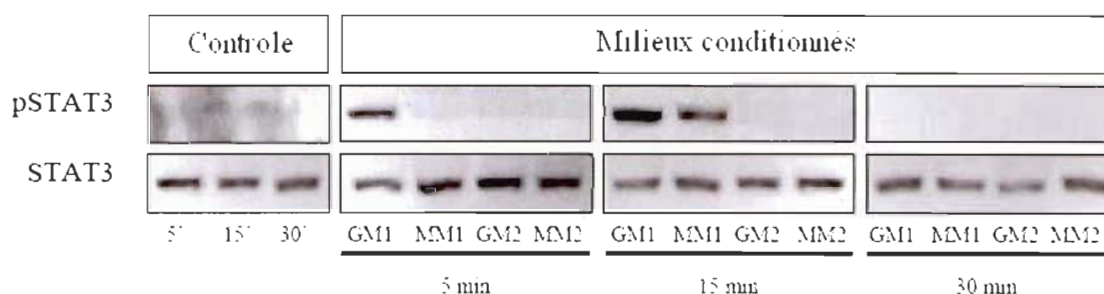


FIGURE 4.10 Les facteurs solubles provenant de GM1 et MM1 activent STAT3 à 5 et 15 minutes de stimulation dans les Hec-1A. Les cellules ont été cultivées dans du milieu sans sérum pendant 4h avant la stimulation pour éliminer les effets des facteurs contenus dans le sérum. Les milieux ont ensuite été remplacés pour les MCs et la réaction a été arrêtée après 5, 15 et 30 minutes. Les résultats montrent que les facteurs solubles de GM1 activent STAT3 après 5 minutes et 15 minutes pour cesser à 30 minutes. Le milieu MM1 induit la phosphorylation de STAT3 mais après 15 minutes et cesse à 30 minutes. Les milieux GM2 et MM2 sont tous deux incapables d'activer STAT3. L'expression de STAT3 total a été utilisée comme contrôle. Expérience représentative de trois stimulations indépendantes.

Les protéines SOCS

Les protéines SOCS ont été découvertes récemment et nos connaissances sont encore très fragmentaires quant à l'étendu de leurs fonctions, particulièrement au niveau des tissus endométriaux. Cependant, des études ont révélé que ces protéines agissent principalement sur la régulation de la voie de signalisation JAK/STAT3 (234). Puisque les facteurs solubles agissent sur l'induction de STAT3, l'expression de SOCS-1 et SOCS-3 a été évaluée. Les résultats (figure 4.11, page 62) montrent qu'après 6h, l'ARNm de SOCS-1 et SOCS-3 est induit avec les MCs de GM1 et MM1 mais peu ou pas avec ceux de GM2 et de MM2. Après 24h, les niveaux chutent pour retourner au contrôle (résultats non montrés).

La voie p38

La voie de signalisation p38 fait partie d'un groupe collectivement appelé les *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Elle est reconnue pour son implication lors de stress cellulaire ainsi que durant l'inflammation (235). Des études récentes ont mise en évidence un effet anti-tumoral suite à l'activation de p38 (220, 236). Les résultats (figure 4.12, page 63) montrent que certains des MCs sont capables d'activer p38 dans la lignée Hec-1A. On observe que les facteurs solubles des milieux GM1 et MM1 ont tous deux activé p38 après 15 minutes. Cependant, comme pour STAT3, l'activation ne s'est pas maintenue et n'est plus détectable à 30 minutes de stimulation. Le MC GM1 induit une réponse plus importante que MM1. Finalement, les MCs GM2 et MM2 n'ont pas induit p38.

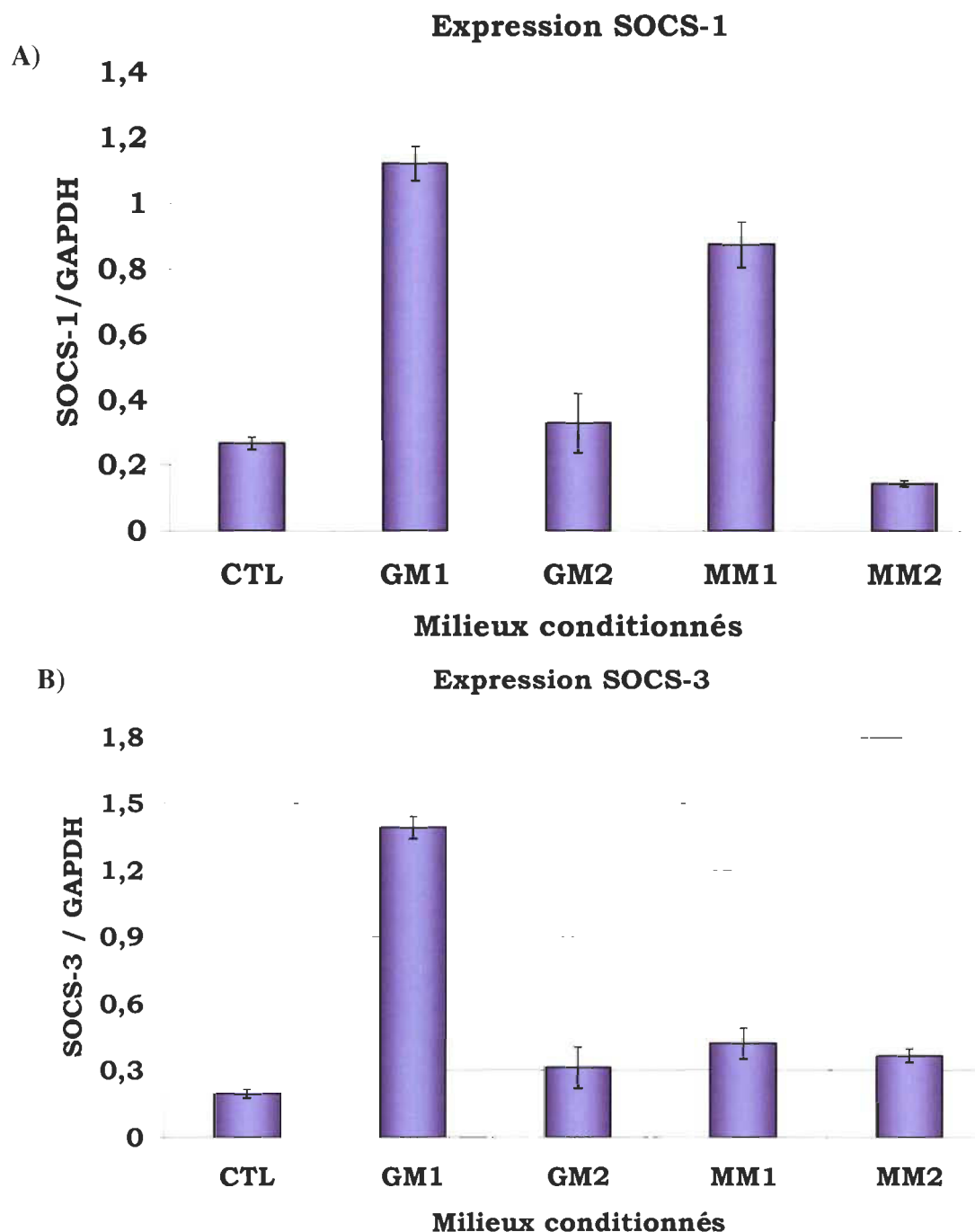


FIGURE 4.11 Induction de SOCS-1 et SOCS-3 par les milieux conditionnés de macrophages. Les cellules ont été incubées avec les M.C correspondants et l'ARN a été recueilli et analysé tel que décrit précédemment. **A)** SOCS-1 : Les facteurs solubles de macrophages GM1 et MM1 induisent SOCS-1 de façon significative avec une induction de 3,6 fois et 3 fois supérieure au contrôle, respectivement. Les deux autres MCs n'affectent pas l'expression de SOCS-1 de façon notable. **B)** SOCS-3 : Le MC de GM1 est le seul capable d'induire SOCS-3 de façon évidente avec une expression 5,4 fois plus grande que le contrôle.

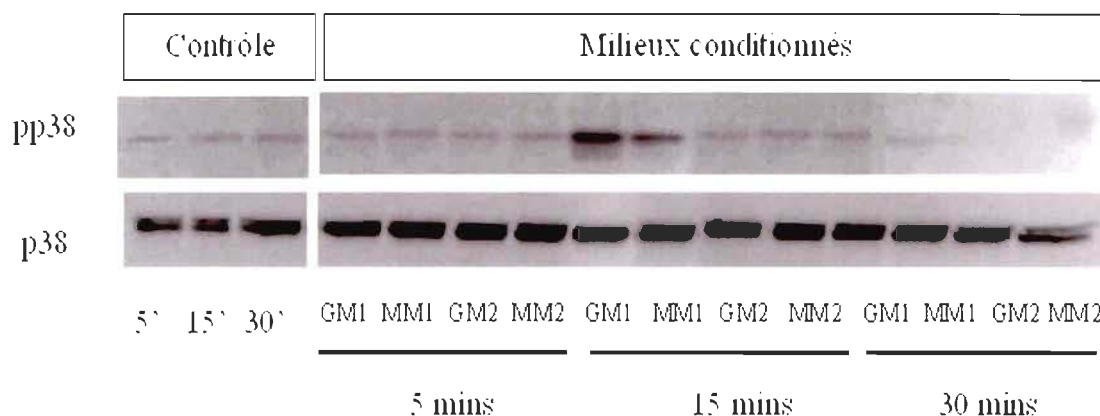


FIGURE 4.12 Les facteurs solubles de GM1 et MM1 activent p38 après 15 minutes. Les cellules ont été préalablement incubées dans un milieu frais sans sérum pendant 4h. Les milieux ont été remplacés par les MCs correspondant. La stimulation a été interrompue à 5, 15 et 30 minutes. Les résultats montrent qu'après 5 minutes, aucun facteur soluble n'a eu d'effet sur les Hec-1A. Après 15 minutes, on observe une activation chez les cellules traitées avec les MCS. GM1 et MM1. Cette activation n'est plus présente après 30 minutes. Le milieu GM1 active p38 de façon plus importante. Les milieux GM2 et MM2 n'activent pas p38 aux trois temps évalués.

4.4 Discussion

La composition de l'environnement immédiat de la tumeur est déterminante dans le fait qu'elle se développera ou non. L'endomètre est un tissu qui subit d'importants changements cycliques au cours la période d'activité sexuelle des femmes et constitue un lieu où il se produit une alternance entre régénération et dégénération tissulaire. De plus, c'est un tissu où le système immunitaire doit être régulé de façon très fine pour permettre l'implantation. Tous ces événements requièrent des interactions entre plusieurs cytokines ainsi que plusieurs leucocytes. L'hypothèse de cette étude repose donc sur la possibilité que l'environnement endométrial puisse être favorable à la survie ainsi qu'à la prolifération des foyers de cellules cancéreuses et que les facteurs solubles de macrophages polarisés y jouent un rôle important.

La présence de macrophages dans les biopsies analysées a été démontrée par l'analyse de la présence de récepteurs cellulaires particulièrement exprimés par ces derniers, ce qui est consistant avec la littérature (237). Selon le tableau 1.2, la proportion des

macrophages serait plus élevée dans la phase sécrétoire que dans la phase proliférative. Or les résultats des analyses de biopsies ne corréleront pas, à priori, avec ces données. Cependant, l'expression des récepteurs CD14 et CD16 n'est pas une indication absolue de la quantité de macrophages présents. Les différences observées peuvent s'expliquer par un différent niveau d'expression. Tel que mentionné plus tôt, les macrophages utérins sont dynamiques et leur phénotype étant variable, il est possible que des macrophages de type M1 pro-inflammatoires se retrouvent principalement durant la phase proliférative. Inversement, des macrophages anti-inflammatoires de type M2 sont plus susceptibles d'être présent lors de la phase sécrétoire, correspondant à la fenêtre d'implantation. Étant donné que les macrophages de type M2 ont une expression de CD14 et CD16 diminuée (49), cela pourrait expliquer l'expression plus faible des gènes bien que le nombre de macrophages lui, puisse être plus élevé. Il est possible d'appliquer le même raisonnement pour les échantillons cancéreux considérant que les TAMs seraient des macrophages de type M2, ces résultats sont donc concordants avec une expression diminuée de CD14 et CD16.

Les résultats obtenus avec les biopsies de tissus endométriaux révèlent que les tissus analysés expriment plusieurs molécules impliquées dans le contrôle négatif de la réponse immunitaire. La cytokine TGF- β est étroitement associée à l'immunosuppression (26, 238). Il a été démontré que l'expression du TGF- β varie lors du cycle normal chez la femme avec une expression maximale durant la phase sécrétoire (119), ce qui est consistant avec les résultats obtenus. Le TGF- β est requis pour l'expression de FoxP3 dans les cellules T CD4+CD25- et leur différenciation en cellules T régulatrices (26). Ceci peut donc contribuer à l'apparition de cellules Treg dans l'endomètre. Les résultats révèlent également la présence de la chémokine CCL22, dont les cellules Treg sont particulièrement sensibles aux effets chimioattractifs (30, 200) ainsi que d'IL-10. L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive qui peut inhiber l'activation des cellules Th par les cellules dendritiques de Langerhans en diminuant l'expression des molécules du CMH II de ces dernières (239) de même que chez les monocytes (240). Parmi ses actions immunosuppressives, l'IL-10 peut stimuler les fonctions régulatrices des cellules T CD4+CD25-, en conjonction avec le TGF- β et l'IL-2 (241). Cela suggère donc la

présence de cellules Treg dans les tissus analysés. Cela est en accord avec d'autres études sur les cancers mammaires, pancréatiques, gastriques et ovariens (198, 201, 242). Ces études ont mis en évidence la présence des cellules Treg ainsi que des cytokines immunosuppressives dans les tumeurs mais aussi dans la circulation sanguine des patients. La présence accrue de FoxP3 dans les tissus endométriaux en phase proliférative peut s'expliquer à lumière d'une étude de 2008 qui a mis en évidence que des niveaux physiologiques d'estrogène pouvaient stimuler la production de cellules Treg chez la souris (243). Ceci pourrait expliquer la forte présence de Treg dans les tissus en phase proliférative, phase durant laquelle l'estrogène est la principale hormone jusqu'au moment de l'ovulation. Cependant, d'autres données tout aussi récentes viennent modifier l'interprétation de ces résultats. Deux études ont montré que FoxP3 pouvait être induit dans diverses lignées de cancers (244, 245). Même si les cancers endométriaux n'ont pas fait l'objet de ces études, elles remettent tout de même en question la spécificité de FoxP3, utilisé jusqu'à tout récemment, comme marqueur spécifique des Tregs puisqu'il est possible qu'il soit induit dans des cellules non lymphocytaires et non thymiques. Indépendamment de ces nouvelles études, ces résultats suggèrent que l'environnement endométrial représente un milieu immunosuppresseur par la présence de cytokines qui ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire localement favorisant potentiellement l'évasion tumorale du système immunitaire.

Outre la présence d'un environnement immunotolérant, l'hypothèse de départ stipule que les macrophages jouent un rôle dans la progression des cancers par la création d'un environnement pro-inflammatoire mais aussi par leurs effets pro-tumoraux. Pour évaluer cette possibilité, différentes approches peuvent être utilisées. Certaines études ont été menées dans un contexte de coculture entre cellules cancéreuses et macrophages (50, 246-248). La pertinence de ces études repose sur le fait qu'elles montrent que les cellules cancéreuses peuvent modifier le comportement des macrophages. Cependant, elles ne renseignent pas sur les conséquences de la polarisation des macrophages et leur influence sur l'activation des cellules cancéreuses. L'approche utilisée ici avait pour but d'évaluer l'effet de la polarisation sur la production des facteurs solubles de

macrophages sans l'interférence des facteurs produits par les cellules tumorales elles-mêmes.

L'analyse des résultats de stimulation aux MCs révèle une similitude d'effet entre les MCs GM1, GM2 et MM1. L'inhibition de la prolifération induite par ces trois milieux est évidente même avec le milieu GM2. On aurait pu s'attendre à ce que le milieu GM2 se comporte davantage comme le MM2 étant donné que les macrophages ont été soumis à la même stimulation avec l'IL-4/IL-10. Cependant, ce n'est pas le cas. Seul le milieu MM2 correspond au profil pro-tumoral associé aux macrophages de type M2. Les résultats de l'expression des gènes vont également dans le même sens. Tous les gènes étudiés ont été induits préférentiellement par les milieux de type M1 mais aussi par le GM2. Ces résultats sont inattendus. En effet, même si les macrophages ont été stimulés pour adopter un profil M2, on observe un comportement d'avantage orienté en M1, la différence essentielle étant la pré-stimulation avec le GM-CSF. Une étude permet peut-être de mieux comprendre ces résultats en tenant compte des différences entre les macrophages générés avec le GM-CSF vs M-CSF. Cette étude de Fleetwood AJ *et al.* (249) a montré que les macrophages générés par le GM-CSF ou le M-CSF seuls peuvent adopter un profil fonctionnel ressemblant soit à des macrophages de type M1 ou M2, respectivement. Ils ont montré que des macrophages murins prétraités au GM-CSF sécrétaient des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, IL-23, et le TNF- α après stimulation au LPS. Au contraire, ceux prétraités avec M-CSF ont vu leur expression de ces facteurs diminuer au profit de l'IL-10. Cela peut donc expliquer pourquoi les macrophages GM-CSF ont donné des résultats qui correspondent plus à un profil pro-inflammatoire. Une autre information qui ressort des résultats est que le traitement à l'IL-4/IL-10 des monocytes traités au GM-CSF semble modifier le profil de sécrétion des facteurs solubles et confère au GM2 des actions ressemblant davantage à des M1 que des M2. On peut donc conclure que l'utilisation du GM-CSF ou du M-CSF influence la polarisation des macrophages car ces deux cytokines peuvent modifier la réponse de ces derniers aux stimuli utilisés pour induire leur polarisation.

Depuis plusieurs années, des données expérimentales et épidémiologiques montrent que la progression tumorale est associée à l'inflammation chronique (38, 250, 251). En conséquence, la possibilité que les macrophages puissent contribuer à l'inflammation a été évaluée. Les résultats d'expression des gènes révèlent que l'IL-6 n'est induit que par le milieu GM1. Il est possible que ce MC soit indirectement responsable de l'induction d'IL-6. Par exemple, l'IL-1 peut induire l'IL-6 dans des chondrocytes humains normaux (252) ou cancéreux (253). On a aussi montré que l'oncostatine M, qui est dans la même famille de cytokines, peut induire IL-6 dans les fibroblastes murins (254). Le LIF peut aussi stimuler la sécrétion d'IL-6 dans les ostéoblastes de rats (255). Il est possible que le LIF, induit lui aussi par le GM1, puisse influencer en retour l'expression d'IL-6 lors de la stimulation par le MC, bien que le milieu MM1 exprime aussi le LIF. Bien entendu, il est possible que d'autres facteurs non étudiés ici soient responsables du résultat observé pour l'expression d'IL-6.

In vivo, les macrophages peuvent attaquer leur cible par divers mécanismes comme la sécrétion de NO, mais aussi par la sécrétion de certaines cytokines comme le TNF- α (256). Bien qu'il soit difficile de dire quels facteurs solubles produits par les GM1, GM2 et MM2 inhibent la prolifération des cellules, il est peu probable que des dérivés oxygénés en soit la raison puisque le NO est un gaz et ne reste pas dans les milieux conditionnés. Il agit en périphérie immédiate du macrophage et requière donc un contact cellule-cellule. L'analyse de l'expression du TNF- α est intéressante car on remarque que son expression corrèle bien avec l'inhibition de la prolifération observée par le test au MTT. Le TNF- α est une cytokine aux multiples fonctions. Comme son nom l'indique, le TNF- α est un facteur à la fois pro-tumoral (257, 258), mais également anti-tumoral en combinaison avec l'INF- γ (259, 260). Son expression par les cellules cancéreuses pourrait favoriser la survie et la dissémination de ces dernières. Le TNF- α pourrait être responsable de l'inhibition de la prolifération observée par MTT. Un argument pour appuyer cette idée vient d'une étude dans laquelle on a démontré que des cellules de mélanomes murins étaient plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF- α lorsque traitée avec de l'IL-6 (261). Ceci pourrait expliquer que le milieu GM1 ait été à la fois le plus inhibiteur de la prolifération et à la fois le plus puissant stimulateur de l'expression

d'IL-6 dans les Hec-1A, bien que les différences de prolifération entre les MCs de GM1 vs GM2 et MM1 ne soient pas significativement différentes. Les résultats dans des lignées cellulaires différentes seraient, à ce titre, intéressants pour évaluer si le phénomène est bien général et non dépendant d'une caractéristique particulière des Hec-1A.

Une des caractéristiques des tumeurs solides est qu'elles sont infiltrées par des leucocytes. Parmi ces leucocytes, les macrophages sont généralement recrutés par des chémokines produites localement par les cellules du tissu, mais aussi par les cellules cancéreuses elles-mêmes (207). Une de ces chémokines, MCP-1, est particulièrement importante dans l'attraction des macrophages. Il a été montré que le niveau d'expression élevé de MCP-1 était prédictif d'un mauvais pronostic dans les cancers de la vessie (262) et du sein (263). De plus, tel que discuté plus tôt, certaines études ont montré que MCP-1 possède des capacités angiogéniques potentiellement utiles aux tumeurs (264). CCL22 est une autre chémokine analysée ici. Par son effet chimioattractif sur les Treg, son expression par les cellules cancéreuses stimulées aux facteurs solubles de macrophages est non souhaitable car les Treg pourraient inhiber la réponse immunitaire, favorisant ainsi la progression tumorale. Ces données peuvent s'expliquer si l'on considère que les TAMs ne sont pas absolument des M2 mais peuvent aussi être des M1. Ces résultats s'inscriront dans un modèle global qui sera proposé plus loin sur les TAMs et leurs interactions avec l'environnement tumoral.

La voie JAK/STAT a été associée à la régulation du cycle cellulaire via ses actions sur l'induction de la cyclin D1 (165, 265) et de certains proto-oncogènes comme c-myc et c-fos (266). STAT3 peut aussi induire l'expression de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans l'angiogénèse et la dissémination tumorale comme le VEGF et des MMPs (166). Les résultats de stimulation des Hec-1A montrent que seuls les MCs de GM1 et MM1 ont été capables d'activer cette voie. La voie JAK/STAT3 est importante dans l'activation de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation et ces derniers signalent eux-mêmes via cette voie (267). Il n'est donc pas étonnant d'observer une activation de cette voie par les MCs GM1 et MM1. Cependant, la littérature soutient que

STAT3 seraient aussi très impliqué dans la transformation néoplasique lorsqu'il est activé de façon soutenue, voire constitutive (268). Bien que STAT3 soit associé à la progression des cancers via ses actions prolifératives, une étude a montré que STAT3 pouvait aussi agir comme facteur pro-apoptotique. Abell *et al.* (269) ont montré que les sous unités régulatrices de la PI3K, les protéines p50 α et p55 α , étaient induites par l'activation de STAT3 lors de l'involution de la glande mammaire. Ces sous unités permettent d'inhiber l'activation d'AKT via l'inhibition de la PI3K. Il en résulte le déclenchement de l'apoptose. Il est donc possible qu'un mécanisme semblable ait pu induire l'inhibition de la prolifération des cellules Hec-1A. Il a d'ailleurs été rapporté par la même équipe que le LIF était impliqué dans ce mécanisme d'inhibition de la PI3K via l'induction de STAT3 par son récepteur (270). Il est intéressant de noter que les milieux GM1 et MM1 sont les deux ayant le plus induit l'expression du LIF.

Une autre donnée intéressante peut être dégagée des résultats obtenus ici. Contrairement à ce qui est rapporté par plusieurs études (218, 219, 271, 272), les cellules Hec-1A ont une voie STAT3 qui n'est pas constitutivement activée. En effet, les contrôles sont tous négatifs. Lorsque l'on analyse la méthodologie de ces études, la majorité utilisent des milieux de culture avec sérum. Les résultats présentés ici ont été obtenus dans des milieux sans sérum. Il est donc possible que l'activation apparemment constitutive de STAT3 résultait plutôt des facteurs de croissance présents dans les milieux de culture employés plutôt que d'une activation constitutive.

Certaines études suggèrent que l'activation constitutive de STAT3 pourrait résulter d'une perte d'expression des inhibiteurs naturels de STAT3, les protéines SOCS-1 et SOCS-3. Ces études ont montré que les promoteurs de SOCS-1 et SOCS-3 étaient méthylés dans des modèles de cancers spinocellulaires, de mélanomes et d'adénocarcinome de Barrett (169, 170, 215). Les résultats de stimulation des Hec-1A avec les MCs montrent que SOCS-1 a été induit de façon notable avec les milieux GM1 et MM1. Cela est normal dans la mesure où ces deux milieux ont également activé STAT3. Pour SOCS-3, seulement le milieu GM1 a induit son expression. Bien que SOCS-3 soit aussi un régulateur de la voie STAT3, il a été démontré que SOCS-1 et

SOCS-3 pouvaient être régulés différemment suite à la stimulation avec de l'INF- γ . La stimulation de cellules MCF-7 avec l'INF- γ a induit l'expression de SOCS-1 sans pour autant induire SOCS-3 (273). Cela démontrait que dans certaines situations, SOCS-1 et SOCS-3 peuvent être différemment induits pour réguler STAT3. Ces résultats permettent de penser que chez les Hec-1A, les gènes SOCS-1 et SOCS-3 peuvent être induits. Il ne semble pas que leurs promoteurs soient méthylés comme c'était le cas dans certaines études publiées (169, 170, 173, 215).

La voie de signalisation p38 a été impliquée à la fois dans l'activation du cycle cellulaire (236, 274) alors que d'autres publications ont montré un effet anti-prolifératif (275, 276). Une étude sur des cultures primaires de cellules endométriales normales a montré que la voie p38 était impliquée dans la différenciation et la prolifération de ces cellules (277). p38 étant connu pour être induit par des stimuli inflammatoires, il est normal de constater que les MCs pro-inflammatoires aient pu activer cette voie. Même si à elle seule l'activation de p38 n'est pas suffisante pour induire des altérations cellulaires permanentes sur le métabolisme des cellules endométriales, il est probable qu'en combinaison avec l'action d'autres voies de signalisation, dont STAT3, il puisse en résulter une transformation vers un phénotype cancéreux. Il faut garder à l'esprit que les cancers ne surviennent pas tout d'un coup. Ils sont le résultat de différentes étapes : initiation, promotion et progression (278). Cependant l'environnement endométrial, avec ses caractéristiques inflammatoires et la présence de macrophages qui peuvent adopter un phénotype pro-inflammatoire et pro-tumoral, est un endroit propice au développement et à la progression tumorale qui pourrait impliquer l'activation de STAT3 et p38.

Bien que les TAMs semblent inefficaces contre les cellules cancéreuses et même qu'ils peuvent les supporter, on a montré que dans certaines situations, les TAMs pouvaient se montrer anti-tumoraux. Une manière par laquelle les TAMs pourraient jouer un rôle anti-tumorale est la diminution de l'angiogénèse. Des études ont mis en évidence que les TAMs pouvaient produire du MMP-12 (métalloélastase) et que ce dernier agissait en retour sur le clivage du plasminogène, dont un des fragments est

l'angiostatine (279, 280). L'angiostatine est un inhibiteur naturel de l'angiogénèse qui a été découvert par O'Reilly *et al.* (281). L'angiogénèse est primordiale pour le développement des tumeurs solides et son inhibition fait d'ailleurs partie des stratégies anti-cancéreuses largement étudiées. Le GM-CSF pourrait aussi s'avérer utile pour permettre aux macrophages de retrouver des fonctions tumoricides. En effet, une étude a montré que la stimulation des TAMs par le GM-CSF pouvait améliorer les fonctions cytotoxiques de ces derniers par induction de l'iNOS (282). En effet, la transfection de cellules cancéreuses colorectales humaines avec le gène du GM-CSF murin a inhibé la prolifération et le développement tumoral après inoculation dans des souris athymiques *Ncr-nu/nu*. Les auteurs ont conclu que la lyse médiée par contact était restaurée, possiblement par augmentation de la production de NO puisque l'ajout d'un inhibiteur spécifique de la iNOS diminuait cet effet cytotoxique de 25%.

4.5 Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus avec les biopsies de tissus devront être confirmés par des analyses en immunohistochimie répétées le plus grand nombre de fois. En effet, de telles études permettraient de localiser de façon précise les cytokines, les macrophages, mais aussi les cellules Treg. L'étude de coupes histologiques de tissus endométriaux permettrait d'évaluer le type de macrophage qui se trouve dans les tumeurs, information qu'il est difficile, voire impossible d'obtenir avec des méthodes d'analyse usuelles comme le PCR ou le Western Blot.

L'étude des macrophages polarisés est très prometteuse. Le nombre de publications qui y est dévolue en est une preuve. Maintenant qu'il est établi que les facteurs solubles peuvent activer les cellules cancéreuses, les études futures devront se concentrer sur : 1) évaluer de façon fonctionnelle l'implication de STAT3 et des protéines dans les résultats obtenus par l'utilisation d'inhibiteurs de STAT3 comme le cucurbitacin I (283) ou par ARN interférence des gènes SOCS1 et SOCS3; 2) identifier la nature des facteurs solubles des MCs et ainsi être en mesure de voir les différences qu'entraînent la polarisation sur le profil de sécrétion protéique des macrophages. Quelques études ont été publiées sur l'analyse du contenu de milieux conditionnés par une combinaison

d'électrophorèse en deux dimensions et de spectroscopie de masse (284, 285). Les protéines du MC seraient précipitées. Par la suite, une électrophorèse en deux dimensions serait réalisée. Le patron d'expression présentera probablement des différences qui pourront être analysées davantage. Il sera possible d'isoler les protéines selon leur pI et leur poids moléculaire. Une fois les candidates déterminées, les protéines pourront être extraites du gel en les découpant et en les digérant à la trypsine. Les peptides ainsi obtenus pourront être analysés par spectrométrie de masse *matrix-assisted laser desorption ionisation* (MALDI) *time of flight* (TOF) ou *electrospray ionisation* (ESI)-TOF.

La figure 4.13 à la page 75 présente le modèle suggéré pour expliquer comment les macrophages associés aux tumeurs peuvent contribuer à la progression tumorale. Ce modèle tient compte que les macrophages associés aux tumeurs ne sont possiblement pas seulement de type M2 mais aussi de type M1. Les macrophages qui infiltrent la tumeur seraient alors considérés comme des M2 qui fournissent les facteurs de croissance et favorisent la prolifération alors que les macrophages en périphérie de la tumeur seraient majoritairement de type M1, soutenant l'inflammation et recrutant davantage de leucocytes. Ce modèle tient compte que les MCs de type M1 ont induit plusieurs gènes pro-inflammatoires mais aussi des chémokines (MCP-1, CCL22). Ces chémokines permettraient le recrutement des macrophages et des cellules Treg à partir de la circulation. Les Treg pourraient ainsi freiner en retour la réponse immunitaire anti-tumorale.

Globalement, les résultats suggèrent que l'environnement endométrial est favorable au développement tumoral par la présence de molécules immunosuppressives et de macrophages. Les facteurs solubles de macrophages induisent l'activation des cellules endométriales Hec-1A et ils peuvent modifier la prolifération et l'expression de gènes pro-inflammatoires. Les facteurs présents dans certains milieux peuvent stimuler les voies STAT3 et p38. Les résultats suggèrent également que la stimulation des monocytes avec le GM-CSF vs le M-CSF influence la polarisation médiée par les cytokines IL-4/IL-10. De plus, les analyses ont révélées que STAT3 n'était pas

constitutivement activé chez les Hec-1A et que les gènes régulateurs de la voie STAT3 étaient inductibles, donc non méthylés, contrairement à certaines études qui ont montré l'inverse dans différentes lignées cancéreuses.

Il apparaît de plus en plus probable que la lutte au cancer requerra une approche multidisciplinaire, toujours associée à la prévention. La combinaison chimiothérapie et immunothérapie paraît la solution d'avenir. Pour ce faire, il faudra mieux comprendre les interactions entre le système immunitaire, qui normalement nous protège, et les cellules cancéreuses. Force est d'avouer que le système immunitaire fonctionne généralement bien jusqu'au moment où certaines cellules réussissent à y échapper et détourner ses puissants mécanismes d'action à leur avantage.

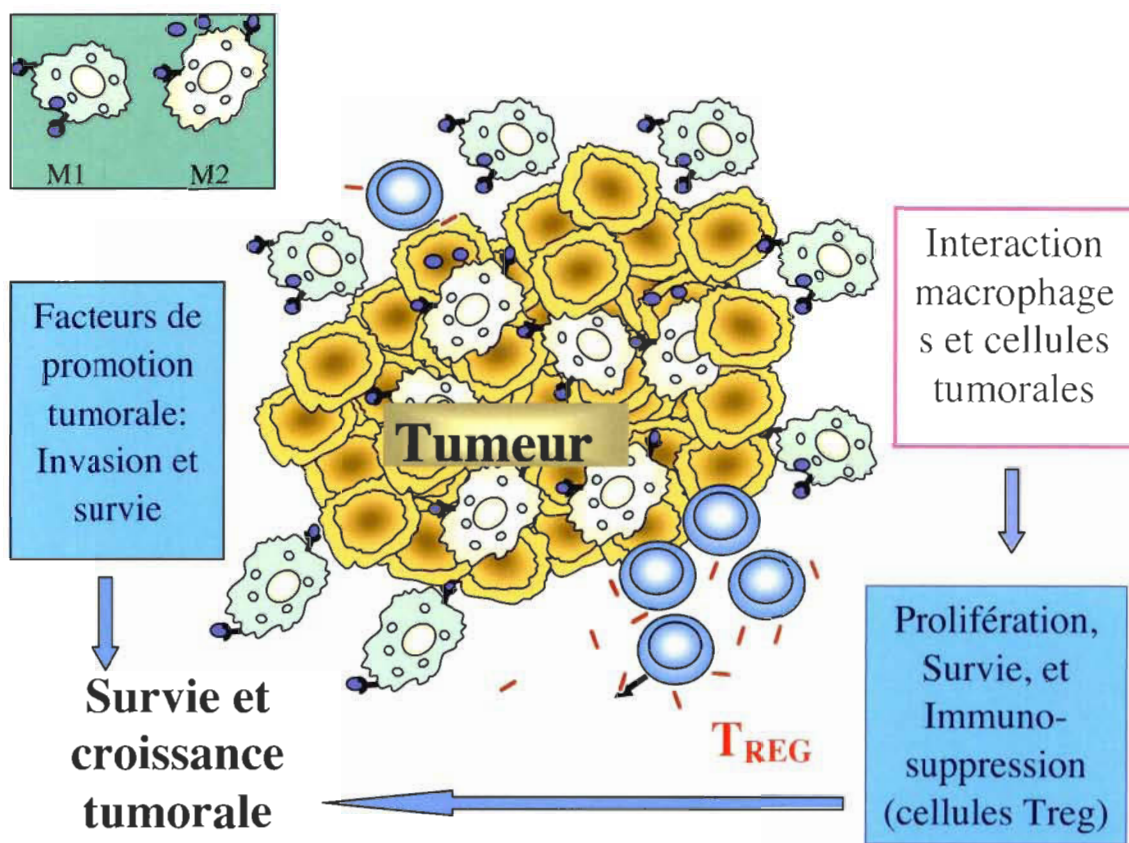


FIGURE 4.13 Modèle d'action des TAMs. Le modèle proposé considère que les macrophages associés aux tumeurs pourraient être à la fois de type M1 et M2. Les M2 se retrouveraient à l'intérieur de la tumeur et lui fourniraient des facteurs de croissance et angiogéniques et favoriseraient directement la prolifération des cellules. Les macrophages en périphérie seraient principalement de type M1 et induiraient la production de facteurs pro-inflammatoires par les cellules mais aussi de chimiokines permettant de recruter davantage de macrophages et des cellules Treg. Cet environnement créerait donc un milieu idéal pour les macrophages avec la présence de cytokines et facteurs de croissance, associé à une immunosuppression locale.

RÉFÉRENCES

1. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 2004. **40**(12): p. 845-59.
2. Rabb, H., *The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 1935-46.
3. Charles A. Janeway; Paul Travers, M.W., Mark Sholmchik, *Immuno biology*. 2001: Garland Publishing. 732.
4. Kimbrell, D.A. and B. Beutler, *The evolution and genetics of innate immunity*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(4): p. 256-67.
5. Martinon, F. and J. Tschopp, *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends Immunol, 2005. **26**(8): p. 447-54.
6. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
7. Goldsby, R.A., Kindt Thomas J., Osborne Barbara A., *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*, DUNOD, Editor. 2001: Paris. p. 259.
8. Goldsby, R.A., Kindt Thomas J., Osborne Barbara A., *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*, DUNOD, Editor. 2001: Paris. p. 96-102.
9. Pantschenko, A.G., et al., *The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression*. Int J Oncol, 2003. **23**(2): p. 269-84.
10. Takii, T., *[In vitro and in vivo study of regulation mechanisms of type 1 interleukin-1 receptor]*. Yakugaku Zasshi, 2001. **121**(1): p. 9-21.
11. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Mechanisms of granule-dependent killing*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 251-62.
12. Institute, R.Y. *Adaptive immune system*. [cited; Available from:

<http://www.rikenresearch.riken.jp/frontline/303/images/fig1.jpg>.

13. Kobayashi, Y., *The role of chemokines in neutrophil biology*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2400-7.
14. Goldsby, R.A., Kindt Thomas J., Osborne Barbara A., *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*, DUNOD, Editor. 2001: Paris. p. 249-250.
15. Goldsby, R.A., Kindt Thomas J., Osborne Barbara A., *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*, DUNOD, Editor. 2001: Paris. p. 203-204.
16. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
17. McGuirk, P. and K.H. Mills, *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases*. Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 450-5.
18. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
19. Umiel, T. and N. Trainin, *Immunological enhancement of tumor growth by syngeneic thymus-derived lymphocytes*. Transplantation, 1974. **18**(3): p. 244-50.
20. Dye, E.S. and R.J. North, *T cell-mediated immunosuppression as an obstacle to adoptive immunotherapy of the P815 mastocytoma and its metastases*. J Exp Med, 1981. **154**(4): p. 1033-42.
21. Lan, R.Y., et al., *Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(6): p. 351-63.
22. Jonsson, H. and S.L. Peng, *Forkhead transcription factors in immunology*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(4): p. 397-409.
23. Lantz, K.A. and K.H. Kaestner, *Winged-helix transcription factors and pancreatic development*. Clin Sci (Lond), 2005. **108**(3): p. 195-204.
24. Piccirillo, C.A. and A.M. Thornton, *Cornerstone of peripheral tolerance:*

- naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. Trends Immunol, 2004. **25**(7): p. 374-80.
25. Fehervari, Z. and S. Sakaguchi, *CD4+ Tregs and immune control*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1209-17.
 26. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
 27. Liu, V.C., et al., *Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2883-92.
 28. Pyzik, M. and C.A. Piccirillo, *TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 335-46.
 29. Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.
 30. Mizukami, Y., et al., *CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer*. Int J Cancer, 2008. **122**(10): p. 2286-93.
 31. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 471-8.
 32. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1295-302.
 33. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars, *CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1538-43.
 34. Geng, J.G., *Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets*

and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. Acta Pharmacol Sin, 2003. **24**(12): p. 1297-300.

35. Ben-Baruch, A., *Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators.* Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 38-52.
36. Serhan, C.N. and J. Savill, *Resolution of inflammation: the beginning programs the end.* Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1191-7.
37. Schwab, J.M., et al., *Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes.* Nature, 2007. **447**(7146): p. 869-74.
38. Lawrence, T. and D.W. Gilroy, *Chronic inflammation: a failure of resolution?* Int J Exp Pathol, 2007. **88**(2): p. 85-94.
39. Russell, J.H. and T.J. Ley, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 323-70.
40. Valinluck, V. and L.C. Sowers, *Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers.* Cancer Res, 2007. **67**(12): p. 5583-6.
41. Dheen, S.T., C. Kaur, and E.A. Ling, *Microglial activation and its implications in the brain diseases.* Curr Med Chem, 2007. **14**(11): p. 1189-97.
42. Ingber, A., *Langerhans cell receptors.* Dermatol Clin, 2007. **25**(4): p. 559-62, ix.
43. Sheth, K. and P. Bankey, *The liver as an immune organ.* Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(2): p. 99-104.
44. Xu, W., et al., *Dendritic cell and macrophage subsets in the handling of dying cells.* Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 567-75.
45. Jeon, S.H., et al., *Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(2): p. 557-66.

46. Seo, K.H., et al., *Essential role for platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation in macrophage-derived angiogenesis*. Eur J Immunol, 2004. **34**(8): p. 2129-37.
47. Campbell, J.H. and G.R. Campbell, *The macrophage as an initiator of atherosclerosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1991. **18**(2): p. 81-4.
48. Cao, B., et al., *The potential role of PDGF, IGF-I, TGF-beta expression in idiopathic pulmonary fibrosis*. Chin Med J (Engl), 2000. **113**(9): p. 776-82.
49. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
50. Chen, J.J., et al., *Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 953-64.
51. Sica, A., et al., *Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy*. Eur J Cancer, 2006. **42**(6): p. 717-27.
52. Mantovani, A., P. Allavena, and A. Sica, *Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression*. Eur J Cancer, 2004. **40**(11): p. 1660-7.
53. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
54. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
55. Kobayashi, S.D., J.M. Voyich, and F.R. DeLeo, *Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1337-44.
56. Martin, P. and S.J. Leibovich, *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(11): p. 599-607.

57. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *Macrophage polarization comes of age*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 344-6.
58. Yang, K.K., et al., *Neutrophil influx in response to a peritoneal infection with Salmonella is delayed in lipopolysaccharide-binding protein or CD14-deficient mice*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4475-80.
59. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
60. London, C.A., A.K. Abbas, and A. Kelso, *Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **63**(1-2): p. 37-44.
61. Yates, A., et al., *Cytokine-modulated regulation of helper T cell populations*. J Theor Biol, 2000. **206**(4): p. 539-60.
62. Ellyard, J.I., L. Simson, and C.R. Parish, *Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe?* Tissue Antigens, 2007. **70**(1): p. 1-11.
63. Kamal, S.M. and K. El Sayed Khalifa, *Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections*. Parasite Immunol, 2006. **28**(10): p. 483-96.
64. Ferenczy, A. and C. Bergeron, *Histology of the human endometrium: from birth to senescence*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **622**: p. 6-27.
65. Art, N.M., *Uterus anatomy*. 2004.
66. Markee, J., *Menstruation in intraocular endometrial transplants in the rhesus monkey*. Contr Embryol Carnegie Instn 1940.
67. Zhang, J., et al., *Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium*. Biol Reprod, 2000. **62**(1): p. 85-94.
68. Marbaix, E., et al., *Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of*

matrix metalloproteinases. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9120-5.

69. Rouen, U.d., *Blastocyte humain*.
70. Loke, Y.W. and A. King, *Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding*. Mol Med Today, 1997. **3**(4): p. 153-9.
71. Diedrich, K., et al., *The role of the endometrium and embryo in human implantation*. Hum Reprod Update, 2007. **13**(4): p. 365-77.
72. Salamonsen, L.A., et al., *Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review*. Placenta, 2003. **24 Suppl A**: p. S76-85.
73. Hess, A.P., et al., *Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators*. Biol Reprod, 2007. **76**(1): p. 102-17.
74. Cohen, P.E., et al., *Macrophages: important accessory cells for reproductive function*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 765-72.
75. Salamonsen, L.A., J. Zhang, and M. Brasted, *Leukocyte networks and human endometrial remodelling*. J Reprod Immunol, 2002. **57**(1-2): p. 95-108.
76. King, A., et al., *Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions*. Hum Reprod, 1993. **8**(12): p. 2061-7.
77. King, A., et al., *Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle*. Hum Immunol, 1989. **24**(3): p. 195-205.
78. Anne Croy, B., et al., *Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 161-85.
79. Wiktor-Jedrzejczak, W., et al., *Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic op/op mouse suggests local, developmental, and humoral requirements for this growth factor*. Exp Hematol, 1991. **19**(10): p. 1049-54.

80. Goetzl, E.J., M.J. Banda, and D. Leppert, *Matrix metalloproteinases in immunity*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 1-4.
81. Bar-Or, A., et al., *Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis*. Brain, 2003. **126**(Pt 12): p. 2738-49.
82. Feinberg, M.W., et al., *Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25766-73.
83. Wu, R., et al., *Macrophage contributions to ovarian function*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(2): p. 119-33.
84. Heazell, A.E. and I.P. Crocker, *Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies*. Placenta, 2008. **29**(9): p. 772-83.
85. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(11-12): p. 1123-36.
86. Uckan, D., et al., *Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(8): p. 655-62.
87. Jerzak, M. and P. Bischof, *Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002. **100**(2): p. 138-42.
88. Kokawa, K., T. Shikone, and R. Nakano, *Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester*. Placenta, 1998. **19**(1): p. 21-6.
89. Miller, L. and J.S. Hunt, *Sex steroid hormones and macrophage function*. Life Sci, 1996. **59**(1): p. 1-14.
90. Phillips, T.A., J. Ni, and J.S. Hunt, *Death-inducing tumour necrosis factor (TNF)*

superfamily ligands and receptors are transcribed in human placenta, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. Placenta, 2001. 22(8-9): p. 663-72.

91. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.* J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.
92. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation.* J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 41-50.
93. Jones, R.L., R.W. Kelly, and H.O. Critchley, *Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation.* Hum Reprod, 1997. **12**(6): p. 1300-6.
94. Jolicoeur, C., et al., *Increased expression of monocyte chemotactic protein-1 in the endometrium of women with endometriosis.* Am J Pathol, 1998. **152**(1): p. 125-33.
95. Azuma, C., et al., *The gene expressions of macrophage colony-stimulating factor (MCSF) and MCSF receptor in the human myometrium during pregnancy: regulation by sex steroid hormones.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **39**(6): p. 883-8.
96. Daiter, E., et al., *Expression of colony-stimulating factor-1 in the human uterus and placenta.* J Clin Endocrinol Metab, 1992. **74**(4): p. 850-8.
97. Kauma, S.W., et al., *Colony-stimulating factor-1 and c-fms expression in human endometrial tissues and placenta during the menstrual cycle and early pregnancy.* J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(4): p. 746-51.
98. Arcuri, F., et al., *Differential regulation of colony stimulating factor 1 and macrophage migration inhibitory factor expression by inflammatory cytokines in term human decidua: implications for macrophage trafficking at the fetal-maternal interface.* Biol Reprod, 2007. **76**(3): p. 433-9.
99. Chegini, N., X.M. Tang, and Q. Dou, *The expression, activity and regulation of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in human endometrial*

epithelial and stromal cells. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(5): p. 459-66.

100. Jasper, M.J., K.P. Tremellen, and S.A. Robertson, *Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage*. J Reprod Immunol, 2007. **73**(1): p. 74-84.
101. Gasson, J.C., *Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1991. **77**(6): p. 1131-45.
102. Seymour, J.F., et al., *Mice lacking both granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF have impaired reproductive capacity, perturbed neonatal granulopoiesis, lung disease, amyloidosis, and reduced long-term survival*. Blood, 1997. **90**(8): p. 3037-49.
103. Robertson, S.A., *GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 287-98.
104. Hilton, D.J., N.A. Nicola, and D. Metcalf, *Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells*. Anal Biochem, 1988. **173**(2): p. 359-67.
105. Arici, A., et al., *Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(6): p. 1908-15.
106. Sawai, K., et al., *Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones*. Biol Reprod, 1997. **56**(5): p. 1274-80.
107. Cai, L.Q., Y.J. Cao, and E.K. Duan, *Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse*. Cytokine, 2000. **12**(11): p. 1676-82.
108. Robb, L., et al., *Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation*. J Reprod Immunol, 2002. **57**(1-2): p. 129-41.
109. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.

110. Vogiagis, D. and L.A. Salamonsen, *Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy*. J Endocrinol, 1999. **160**(2): p. 181-90.
111. Hambartsoumian, E., *Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation*. Am J Reprod Immunol, 1998. **39**(2): p. 137-43.
112. Tsai, H.D., et al., *Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases*. J Assist Reprod Genet, 2000. **17**(8): p. 415-8.
113. Metcalf, D., *The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor*. Stem Cells, 2003. **21**(1): p. 5-14.
114. von Wolff, M., et al., *Endometrial expression and secretion of interleukin-6 throughout the menstrual cycle*. Gynecol Endocrinol, 2002. **16**(2): p. 121-9.
115. Nishino, E., et al., *Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **71**(2): p. 436-41.
116. Philippeaux, M.M. and P.F. Piguet, *Expression of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in the endometrial mucosa during the menstrual cycle*. Am J Pathol, 1993. **143**(2): p. 480-6.
117. Tabibzadeh, S., et al., *Regulation of TNF-alpha mRNA expression in endometrial cells by TNF-alpha and by oestrogen withdrawal*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(12): p. 1141-9.
118. Gustafsson, C., et al., *Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha*. J Reprod Immunol, 2006. **71**(1): p. 41-56.
119. Jones, R.L., et al., *TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta*. Reproduction, 2006. **132**(2): p. 217-32.
120. Saito, S., *Cytokine network at the feto-maternal interface*. J Reprod Immunol, 2000. **47**(2): p. 87-103.

121. Wilczynski, J.R., et al., *'In vitro' cytokine secretion by peripheral blood and decidual lymphocytes during the third trimester of normal pregnancy*. Gynecol Obstet Invest, 2003. **55**(2): p. 68-72.
122. Wegmann, T.G., et al., *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.
123. Dealtry, G.B., M.K. O'Farrell, and N. Fernandez, *The Th2 cytokine environment of the placenta*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **123**(2): p. 107-19.
124. Allgayer, H., W. Holtmeier, and C.F. Dietrich, *[Crohn's disease and cancer risk. Incidence/prevalence, clinical characteristics, and potential prevention strategies]*. Med Klin (Munich), 2007. **102**(9): p. 727-33.
125. von Roon, A.C., et al., *The risk of cancer in patients with Crohn's disease*. Dis Colon Rectum, 2007. **50**(6): p. 839-55.
126. Herszenyi, L., P. Miheller, and Z. Tulassay, *Carcinogenesis in inflammatory bowel disease*. Dig Dis, 2007. **25**(3): p. 267-9.
127. Matsuzaki, K., et al., *Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2007. **46**(1): p. 48-57.
128. Tabor, E., *Hepatocarcinogenesis: hepatitis viruses and altered tumor suppressor gene function*. Princess Takamatsu Symp, 1995. **25**: p. 151-61.
129. Romero-Gallo, J., et al., *Effect of Helicobacter pylori eradication on gastric carcinogenesis*. Lab Invest, 2008.
130. Virchow, V.R., *Reizung und Reizbarkeit* Arch Pathol Anat Klin Med 1858. **14**: p. 1-63.
131. Albilal, J.B., et al., *Systemic lupus erythematosus: a review for dentists*. J Can Dent Assoc, 2007. **73**(9): p. 823-8.
132. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and*

atherosclerosis. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 297-329.

133. Mallika, V., B. Goswami, and M. Rajappa, *Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective*. Angiology, 2007. **58**(5): p. 513-22.
134. Hannawi, S., et al., *Atherosclerotic disease is increased in recent-onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(6): p. R116.
135. Thalhamer, T., M.A. McGrath, and M.M. Harnett, *MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2008.
136. Jaiswal, M., et al., *Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism*. Cancer Res, 2000. **60**(1): p. 184-90.
137. Campos, A.C., et al., *Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation*. Neoplasia, 2007. **9**(12): p. 1111-21.
138. Cobbs, C.S., et al., *Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8670-3.
139. Ferlay J, B.F., Pisani P, Parkin DM, *GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. IARC CancerBase , IARCPress, 2001. **No. 5**.
140. Persson, I., *Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 357-64.
141. Modugno, F., et al., *Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(12): p. 2840-7.
142. Duan, L., et al., *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Risk of Esophageal and Gastric Adenocarcinomas in Los Angeles County*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(1): p. 126-34.

143. Farrow, D.C., et al., *Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1998. **7**(2): p. 97-102.
144. Agrawal, A. and I.S. Fentiman, *NSAIDs and breast cancer: a possible prevention and treatment strategy*. Int J Clin Pract, 2008. **62**(3): p. 444-449.
145. Olsen, J.H., et al., *Use of NSAIDs, smoking and lung cancer risk*. Br J Cancer, 2008. **98**(1): p. 232-7.
146. Gao, J., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells*. Cancer Sci, 2004. **95**(11): p. 901-7.
147. Karin, M., *NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets*. Mol Carcinog, 2006. **45**(6): p. 355-61.
148. Pikarsky, E., et al., *NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer*. Nature, 2004. **431**(7007): p. 461-6.
149. Kulms, D. and T. Schwarz, *NF-kappaB and cytokines*. Vitam Horm, 2006. **74**: p. 283-300.
150. Kumar, A., et al., *Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease*. J Mol Med, 2004. **82**(7): p. 434-48.
151. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
152. Sugino, N., et al., *Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2alpha production through nuclear factor-kappaB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation*. J Reprod Dev, 2004. **50**(2): p. 215-25.
153. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.

154. Pallares, J., et al., *Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 569-77.
155. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
156. Antony, P., et al., *B-cell antigen receptor activates transcription factors NFAT (nuclear factor of activated T-cells) and NF-kappaB (nuclear factor kappaB) via a mechanism that involves diacylglycerol*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 1): p. 113-5.
157. Carmody, R.J. and Y.H. Chen, *Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(1): p. 31-41.
158. Lim, C.P. and X. Cao, *Structure, function, and regulation of STAT proteins*. Mol Biosyst, 2006. **2**(11): p. 536-50.
159. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-21.
160. Constantinescu, S.N., M. Girardot, and C. Pecquet, *Mining for JAK-STAT mutations in cancer*. Trends Biochem Sci, 2008.
161. Das, S., et al., *Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) is a constitutively expressed survival factor in human prostate cancer*. Prostate, 2007. **67**(14): p. 1550-64.
162. Haybaeck, J., et al., *STAT-1 expression in human glioblastoma and peritumoral tissue*. Anticancer Res, 2007. **27**(6B): p. 3829-35.
163. Sheen-Chen, S.M., et al., *Signal transducer and activator of transcription 1 in breast cancer: analysis with tissue microarray*. Anticancer Res, 2007. **27**(4B): p. 2481-6.
164. Bromberg, J.F. and J.E. Darnell, Jr., *Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 425-8.

165. Masuda, M., et al., *Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3351-5.
166. Alvarez, J.V., et al., *Identification of a genetic signature of activated signal transducer and activator of transcription 3 in human tumors*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5054-62.
167. Bullock, A.N., et al., *Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7637-42.
168. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
169. Tischoff, I., et al., *Methylation of SOCS-3 and SOCS-1 in the carcinogenesis of Barrett's adenocarcinoma*. Gut, 2007. **56**(8): p. 1047-53.
170. Tokita, T., et al., *Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas*. Int J Oncol, 2007. **30**(3): p. 689-94.
171. Hatirnaz, O., et al., *The SOCS-1 gene methylation in chronic myeloid leukemia patients*. Am J Hematol, 2007. **82**(8): p. 729-30.
172. Galm, O., et al., *SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2784-8.
173. Yoshikawa, H., et al., *SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 29-35.
174. Lu, B., Y.J. Jiang, and P.C. Choy, *17-Beta estradiol enhances prostaglandin E2 production in human U937-derived macrophages*. Mol Cell Biochem, 2004. **262**(1-2): p. 101-10.
175. Vucic, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *Epigenetics of cancer progression*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(2): p. 215-34.

176. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1358-75.
177. Hedelin, H., S. Holmang, and L. Wiman, *The cost of bladder tumour treatment and follow-up*. Scand J Urol Nephrol, 2002. **36**(5): p. 344-7.
178. Huot, J., et al., *Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells*. Circ Res, 1997. **80**(3): p. 383-92.
179. Jinlian, L., Z. Yingbin, and W. Chunbo, *p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation*. J Biomed Sci, 2007. **14**(3): p. 303-12.
180. Perregaux, D.G., et al., *Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence*. Mol Pharmacol, 1995. **48**(3): p. 433-42.
181. Meja, K.K., et al., *p38 MAP kinase and MKK-1 co-operate in the generation of GM-CSF from LPS-stimulated human monocytes by an NF-kappa B-independent mechanism*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(6): p. 1143-53.
182. Scicchitano, M.S., et al., *Role of p38 in regulation of hematopoiesis: Effect of p38 inhibition on cytokine production and transcription factor activity in human bone marrow stromal cells*. Blood Cells Mol Dis, 2007.
183. Badger, A.M., et al., *Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **279**(3): p. 1453-61.
184. Badger, A.M., et al., *SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes*. J Immunol, 1998. **161**(1): p. 467-73.
185. Ea, H.K., et al., *Octacalcium phosphate crystals directly stimulate expression of inducible nitric oxide synthase through p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in articular chondrocytes*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(5): p. R915-26.
186. De Cesaris, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-6*

- production and integrin ligand expression by distinct transduction pathways.* J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7566-71.
187. Xing, H., et al., *Fibronectin-mediated activation of Akt2 protects human ovarian and breast cancer cells from docetaxel-induced apoptosis via inhibition of the p38 pathway.* Apoptosis, 2007.
 188. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
 189. Iwasa, H., J. Han, and F. Ishikawa, *Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.* Genes Cells, 2003. **8**(2): p. 131-44.
 190. Wang, W., et al., *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3389-403.
 191. Faust, D., et al., *p38alpha MAPK is required for contact inhibition.* Oncogene, 2005. **24**(53): p. 7941-5.
 192. Slisz, M., E. Rothenberger, and D. Hutter, *Attenuation of p38 MAPK activity upon contact inhibition in fibroblasts.* Mol Cell Biochem, 2008. **308**(1-2): p. 65-73.
 193. Mantovani, A., et al., *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion.* Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 315-22.
 194. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies.* J Pathol, 2002. **196**(3): p. 254-65.
 195. Dimitriadis, E., et al., *Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation.* Hum Reprod Update, 2005. **11**(6): p. 613-30.
 196. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody.* Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3128-33.

197. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
198. Liyanage, U.K., et al., *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2756-61.
199. Viguier, M., et al., *Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1444-53.
200. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
201. Li, X., et al., *Human ovarian carcinoma cells generate CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from peripheral CD4(+)CD25(-) T cells through secreting TGF-beta*. Cancer Lett, 2007. **253**(1): p. 144-53.
202. Wolf, D., et al., *The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8326-31.
203. Visser, J., et al., *Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(2): p. 199-209.
204. Nakamura, T., et al., *Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer*. Cancer Sci, 2007. **98**(6): p. 874-81.
205. Jorgensen, C., C. Bologna, and J. Sany, *Autoimmunity. Insights provided by the SCID mouse model*. Rev Rhum Engl Ed, 1995. **62**(7-8): p. 519-24.
206. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
207. Mantovani, A., et al., *Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(3): p. 155-60.

208. Teicher, B.A., *Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(21): p. 6247-51.
209. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity*. Immunology, 2006. **119**(2): p. 254-64.
210. Andreesen, R., et al., *Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation*. J Leukoc Biol, 1990. **47**(6): p. 490-7.
211. Gottfried, E., et al., *Identification of genes expressed in tumor-associated macrophages*. Immunobiology, 2003. **207**(5): p. 351-9.
212. Spottl, T., et al., *Monocyte differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(2): p. 241-51.
213. Allavena, P., et al., *The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007.
214. Rollins, B.J., *Inflammatory chemokines in cancer growth and progression*. Eur J Cancer, 2006. **42**(6): p. 760-7.
215. Lee, T.L., et al., *Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(1): p. 8-19.
216. Aoki, Y., G.M. Feldman, and G. Tosato, *Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1535-42.
217. Baus, D. and E. Pfitzner, *Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells*. Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1404-13.
218. Kijima, T., et al., *STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo*. Cell Growth Differ, 2002. **13**(8): p. 355-62.

219. Chen, C.L., et al., *Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers*. Br J Cancer, 2007. **96**(4): p. 591-9.
220. Han, J. and P. Sun, *The pathways to tumor suppression via route p38*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(8): p. 364-71.
221. Mantovani, A., *Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines*. Lab Invest, 1994. **71**(1): p. 5-16.
222. Seager Danciger, J., et al., *Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation*. J Immunol Methods, 2004. **288**(1-2): p. 123-34.
223. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
224. Frumento, G., et al., *Targeting tumor-related immunosuppression for cancer immunotherapy*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2006. **6**(3): p. 233-7.
225. Karakousis, C.P., S. Sharma, and S.P. Brooks, *Is immunosuppression at the tumor site mechanism of evasion of a systemic response?* J Med, 2003. **34**(1-6): p. 3-14.
226. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 331-7.
227. Ramsdell, F., *Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?* Immunity, 2003. **19**(2): p. 165-8.
228. Chantry, D., et al., *Profile of human macrophage transcripts: insights into macrophage biology and identification of novel chemokines*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 49-54.
229. Iellem, A., et al., *Unique chemotactic response profile and specific expression of*

- chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.* J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 847-53.
230. Old, L.J., *Tumor necrosis factor.* Sci Am, 1988. **258**(5): p. 59-60, 69-75.
 231. Rivas, M.A., et al., *TNFalpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappaB-dependent pathways.* Exp Cell Res, 2007.
 232. Szlosarek, P., K.A. Charles, and F.R. Balkwill, *Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter.* Eur J Cancer, 2006. **42**(6): p. 745-50.
 233. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
 234. Cooney, R.N., *Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway.* Shock, 2002. **17**(2): p. 83-90.
 235. New, L. and J. Han, *The p38 MAP kinase pathway and its biological function.* Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**(5): p. 220-8.
 236. Bradham, C. and D.R. McClay, *p38 MAPK in development and cancer.* Cell Cycle, 2006. **5**(8): p. 824-8.
 237. Ohno, S., et al., *Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer.* Anticancer Res, 2004. **24**(5C): p. 3335-42.
 238. Marie, J.C., et al., *TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells.* J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1061-7.
 239. Peguet-Navarro, J., et al., *Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells.* Eur J Immunol, 1994. **24**(4): p. 884-91.
 240. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-*

presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.

241. Zheng, S.G., et al., *Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10.* J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5213-21.
242. Ichihara, F., et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(12): p. 4404-8.
243. Tai, P., et al., *Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen.* J Cell Physiol, 2008. **214**(2): p. 456-64.
244. Karanikas, V., et al., *Foxp3 expression in human cancer cells.* J Transl Med, 2008. **6**(1): p. 19.
245. Ebert, L.M., et al., *The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells.* Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 3001-9.
246. White, E.S., et al., *Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity.* J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7549-55.
247. Toulza, F., J.F. Eliaou, and V. Pinet, *Breast tumor cell soluble factors induce monocytes to produce angiogenic but not angiostatic CXC chemokines.* Int J Cancer, 2005. **115**(3): p. 429-36.
248. Hagemann, T., et al., *Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype.* J Immunol, 2006. **176**(8): p. 5023-32.
249. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation.* J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5245-52.
250. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.

251. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
252. Fan, Z., et al., *IL-1beta induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NFkappaB signaling pathways*. Cytokine, 2004. **28**(1): p. 17-24.
253. Radons, J., W. Falk, and T.E. Schubert, *Interleukin-10 does not affect IL-1-induced interleukin-6 and metalloproteinase production in human chondrosarcoma cells, SWI353*. Int J Mol Med, 2006. **17**(2): p. 377-83.
254. Smyth, D.C., C. Kerr, and C.D. Richards, *Oncostatin M-induced IL-6 expression in murine fibroblasts requires the activation of protein kinase Cdelta*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8740-7.
255. Liu, F., J.E. Aubin, and L. Malaval, *Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF*. Bone, 2002. **31**(1): p. 212-9.
256. Nathan, C.F., *Secretory products of macrophages*. J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 319-26.
257. Malik, S.T., et al., *Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice*. Eur J Cancer, 1990. **26**(10): p. 1031-4.
258. Mutch, D.G., et al., *Proliferative and antiproliferative effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on cell lines derived from cervical and ovarian malignancies*. Am J Obstet Gynecol, 1990. **163**(6 Pt 1): p. 1920-4.
259. van Valen, F., et al., *Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce a synergistic antiproliferative response in human Ewing's sarcoma cells in vitro*. J Cancer Res Clin Oncol, 1993. **119**(10): p. 615-21.
260. Kost, E.R., D.G. Mutch, and T.J. Herzog, *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce synergistic cytolytic effects in ovarian cancer cell lines-roles of the TR60 and TR80 tumor necrosis factor receptors*. Gynecol Oncol, 1999. **72**(3): p. 392-401.
261. Wagley, Y., et al., *The IL-6/sIL-6R treatment of a malignant melanoma cell line*

- enhances susceptibility to TNF-alpha-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **354**(4): p. 985-91.
262. Amann, B., et al., *Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer. Br J Urol*, 1998. **82**(1): p. 118-21.
 263. Saji, H., et al., *Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. Cancer*, 2001. **92**(5): p. 1085-91.
 264. Salcedo, R., et al., *Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. Blood*, 2000. **96**(1): p. 34-40.
 265. Sinibaldi, D., et al., *Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. Oncogene*, 2000. **19**(48): p. 5419-27.
 266. Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi, *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2548-56.
 267. Yoshimura, A., *Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. Cancer Sci*, 2006. **97**(6): p. 439-47.
 268. Frank, D.A., *STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. Cancer Lett*, 2007. **251**(2): p. 199-210.
 269. Abell, K., et al., *Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. Nat Cell Biol*, 2005. **7**(4): p. 392-8.
 270. Abell, K. and C.J. Watson, *The Jak/Stat pathway: a novel way to regulate PI3K activity. Cell Cycle*, 2005. **4**(7): p. 897-900.
 271. Lin, Q., et al., *Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. Am J Pathol*, 2005. **167**(4): p. 969-80.

272. Corvinus, F.M., et al., *Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth*. Neoplasia, 2005. **7**(6): p. 545-55.
273. Evans, M.K., et al., *Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals*. Oncogene, 2007. **26**(13): p. 1941-8.
274. Bulavin, D.V. and A.J. Fornace, Jr., *p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor*. Adv Cancer Res, 2004. **92**: p. 95-118.
275. Molnar, A., et al., *Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13229-35.
276. Wang, X., et al., *Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4543-52.
277. Hong, I.S., et al., *Roles of p38 and c-jun in the differentiation, proliferation and immortalization of normal human endometrial cells*. Hum Reprod, 2004. **19**(10): p. 2192-9.
278. Anisimov, V.N., *Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon*. Mech Ageing Dev, 2008.
279. Cornelius, L.A., et al., *Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6845-52.
280. Dong, Z., et al., *Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma*. Cell, 1997. **88**(6): p. 801-10.
281. O'Reilly, M.S., et al., *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma*. Cell, 1994. **79**(2): p. 315-28.
282. Shinohara, H., et al., *Induction of chemokine secretion and enhancement of contact-dependent macrophage cytotoxicity by engineered expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human colon cancer cells*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2728-37.

283. Fujita, M., et al., *Inhibition of STAT3 promotes the efficacy of adoptive transfer therapy using type-1 CTLs by modulation of the immunological microenvironment in a murine intracranial glioma*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2089-98.
284. Chin, A.C., et al., *Identification of proteins from feeder conditioned medium that support human embryonic stem cells*. J Biotechnol, 2007. **130**(3): p. 320-8.
285. Dowling, P., et al., *Purification and identification of a 7.6-kDa protein in media conditioned by superinvasive cancer cells*. Anticancer Res, 2007. **27**(3A): p. 1309-17.